Série A, N° 3972
N° d'ordre :
4823

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Bernard MUEL

1re THESE.

"Etudes sur la luminescence du 3-4 benzopyrène et de polycycles aromatiques apparentés, en solution à basse température".

2e THESE.

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 27 NOV. 1962 **devant la Commission d'examen.**

MM. MATHIEU *Président.*
DAUDEL, LAVOREL, ROUSSET *Examinateurs.*

Série A, N° 3972
N° d'ordre :
4823

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Bernard MUEL

1re THESE.

"Etudes sur la luminescence du 3-4 benzopyrène et de polycycles aromatiques apparentés, en solution à basse température".

2e THESE.

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **devant la Commission d'examen.**

MM. MATHIEU *Président.*
DAUDEL, LAVOREL } *Examinateurs.*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen ..... M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristal.
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie Vég. (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie Générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Melle COUSIN	T	Biologie Animale (SPCN)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie SPCN et sédim.
GAUTHERET	T	Biologie Vég. (P.C.B.)
LUCAS R.	T	Recherches Physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique exp. des Fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie Végétale (SPCN)
Mle CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie Générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique Générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie Organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique Céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories Physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallog.
J.P. MATHIEU	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie Végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie Végétale
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.)
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale
BENARD	T	Chimie Minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques Mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie Végétale
MARECHAL	T	Optique théorique et Appl.
KIRRMANN	T	Théories Chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mle LE BRETON	T	Physiologie de la nutri.
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie Comp.
EHRESMANN	T	Topologie Algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et Géologie dynamique
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Tech. Mathém. de la Phys.

ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
RIZET	T	Génétique (Orsay
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique Théorique
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
M. LEVY	T	Physique théorique des Hautes Energies (Orsay)
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL-PY		Biologie Végétale (PCB)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides
LEDERER	T	Chimie biologique
Mme DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL A.	T	Chimie Minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie Vég. BMPV
CASTAING	T	Physique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralo. et Cristallog.
MOYSE	T	Physiologie Végétale (Orsay)
NOIROT	T	Evolution des Etres Org.
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay)
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique Nucl. et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie Physico-chim.
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches Physiques
GUINOCHET	T	Biol. Vég. SPCN (Orsay)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
Melle JOSIEN	T	Chimie S.P.C.N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay)
DENY	T	Mathématiques Génér. (Orsay)
GERMAIN	T	Mécan. théor. des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie Physique
BERTHELOT	T	Phys. Fondamentale des Hautes Energies (Orsay)
BRICART	T	Météorologie et Phys. de l'Atmosphère
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie
FRIEDEL	T	Physique des Solides (Ors)
M. JULIA		Etudes des Moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	Biol. Animale (SPCN) (Orsay)
MAGAT		Physico-chimie des radioéléments
Melle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiol. Anim. (Orsay)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiol. Vég. BMPV (Orsay)
GUERIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
CHATELET M.	T	Chimie (P.C.B.)
JEAN	T	Physique Nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique S.P.C.N.
MICHEL L.		Phys. Théor. des Hautes Energies (Orsay)
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
BOUISSIERES		Chimie des Radioéléments (Orsay)
Mme COUTURE	T	Thermodynamique et Méc. physique
ELLENBERGER	T	Géologie appli. s/le terr.
FRANC		Biol. Animale (P.C.B.
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)
STOLKOWSKI		Physiologie générale
ACHER		Chimie Biol. (Orsay)
BAUDOIN		Biologie animale P.C.B.
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (M.G.P.)
DURAND-DELGA		Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appl. à la Chimie Théor. et à la Physique Nucléaire
Mle FOURCROY		Biol. Végétale (S.P.C.N.)
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Méc. Analytique et Méc. céleste
Melle Veil		Physiologie Générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécan. Phys. et Expérim.
LACOMBE	T	Métallur. des métaux Nucl.
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématiques MPC (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie phys. et Géol. Dynamique
COMOLET	T	Mécanique des Fluides
CORABOEUF		Physiologie Animale
DELLOUE		Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie Animale P.C.B.
JULLIEN J.		Chimie P.C.B.
MALGRANGE	T	Tech. Math. de la Phys.
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE		Physique ENS. (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Mathématiques E.N.S. féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Mécanique céleste

SECRETAIRE GENERAL ..... R. POULLAIN.

A mes Parents

Que Monsieur J. TREFOUEL, Membre de l'Institut, Directeur de l'Institut Pasteur, veuille agréer l'expression de ma respectueuse reconnaissance pour avoir permis mon entrée à l'Institut Pasteur et la réalisation de ce travail.

Je suis particulièrement heureux de témoigner, à cette occasion, ma profonde gratitude et mon respectueux attachement à Monsieur le Docteur R. LATARJET, Directeur du Laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium. Avant tout, je lui suis reconnaissant d'avoir su m'inculquer par son exemple et ses recommandations, les principes qui doivent être ceux du chercheur scientifique. D'autre part, je le remercie chaleureusement pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués au cours de la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur J.P. MATHIEU a bien voulu assumer la direction de ma thèse. Je lui suis très obligé de l'intérêt qu'il a pris à mon travail et de ses précieuses critiques et suggestions qui m'en ont permis l'achèvement.

Je prie Monsieur le Professeur A. LACASSAGNE, Membre de l'Institut, Directeur honoraire du Laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium, d'agréer l'expression de ma respectueuse gratitude pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour le soutien qu'il m'a accordé par la suite.

Je suis redevable à Madame J.P. MATHIEU de ma formation de spectroscopiste. Je la remercie très sincèrement pour ses conseils avisés.

Monsieur le Professeur R. DAUDEL et Monsieur O. CHALVET, ainsi que Monsieur H. POULET, m'ont été d'un grand secours pour l'interprétation théorique de mes résultats. Je les en remercie très vivement.

Monsieur le Professeur M. KASHA a bien voulu me faire part de quelques observations qui m'ont permis de trouver une interprétation au phénomène de fluorescence retardée; je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie Monsieur le Docteur J.P. COLPA de m'avoir communiqué des résultats théoriques qui m'ont aidé à préciser cette interprétation.

Les expériences de métabolisme ont été effectuées en collaboration étroite avec Madame R. DAUDEL et son équipe. Je la remercie très vivement d'avoir permis que ces expériences, auxquelles je me suis vivement intéressé, soient mentionnées ici.

J'ai collaboré d'une façon suivie avec Monsieur M. HUBERT-HABART pour les expériences analytiques. Je le remercie très amicalement pour la part qu'il a prise à l'élaboration de cette thèse. Que Monsieur R. ROYER, Chef du Laboratoire de Chimie Organique, soit associé à ces remerciements.

Je suis heureux de manifester ma gratitude à Monsieur M. FRILLEY qui a bien voulu me conseiller pour certains points délicats des montages nécessaires à mes expériences. Je remercie cordialement Monsieur R. SOUILLE qui en a exécuté avec maîtrise la partie mécanique.

Je remercie Monsieur J.L. CUZIN, Directeur des Laboratoires du S.E.I.T.A., de l'aide qu'il a bien voulu m'accorder.

Que Madame S. BAZILE, Administrateur du Laboratoire, veuille trouver ici mes sincères remerciements pour son concours.

Monsieur J. VONS, chargé du service de photographie de la Fondation Curie, a réalisé la reproduction des documents qui illustrent cette thèse, je lui en suis reconnaissant.

x

x x

Je remercie très amicalement Mademoiselle G. LACROIX pour sa précieuse collaboration, ainsi que Monsieur B. GARMIRIAN pour son aide efficace. Ils ont participé quotidiennement à l'élaboration de ce travail.

x

x x

AVANT - PROPOS

Cette thèse expose l'ensemble des recherches que j'ai effectuées dans le domaine de la luminescence des hydrocarbures aromatiques, au Laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium.

Bien que la plupart des travaux aient été entrepris en vue d'applications possibles à la biologie, et qu'ils soient souvent le fruit d'une collaboration étroite avec des chercheurs d'autres disciplines, je me suis en général limité, dans la présentation, à l'aspect physicochimique des problèmes, puisque c'est là qu'a porté ma contribution.

Dès mon arrivée au laboratoire, M. LATARJET, qui avait préparé le terrain depuis un certain temps en faisant construire deux monochromateurs géants, me proposa d'étudier la luminescence des polycycles aromatiques.

Cette étude était entreprise avec les deux objectifs suivants :

1° - Mise au point de l'appareillage et des techniques permettant la détection des polycycles aromatiques dans des milieux complexes d'intérêt biologique.

2° - Détermination des hauteurs des niveaux d'excitation de ces composés et étude des mécanismes de l'excitation de la luminescence, avec l'idée d'une éventuelle intervention de ces données dans l'activité biologique spécifique de ces substances.

Mon premier travail a été consacré aux techniques de spectrophotométrie et à la mise au point des montages permettant l'observation des spectres de luminescence. La détermination soigneuse des facteurs de cor-

rection permettant d'obtenir les courbes spectrales d'énergie des rayonnements étudiés, en a représenté une part importante.

Les premières études ont porté sur les spectres de fluorescence des benzacridines. Ces composés avaient été étudiés d'une façon approfondie par l'équipe de M. le Professeur LACASSAGNE, du point de vue théorique, chimique, physicochimique et biologique. L'étude des spectres de fluorescence devait compléter celle des spectres d'absorption, réalisée par Mme MATHIEU. Il est apparu que, conformément à la théorie, les courbes spectrales d'énergie de la fluorescence des solutions se déduisent des spectres d'absorption, dans la région des grandes longueurs d'ondes, par une simple opération de symétrie et que les hauteurs du niveau premier singulet déterminées par les deux méthodes sont toujours en bonne concordance. Ce premier travail (qui ne sera pas relaté dans cette thèse) m'a permis de me rendre compte de certaines difficultés qui se présentent pour la détermination des spectres de luminescence des substances pures. Il m'a montré en particulier l'importance de la pureté des échantillons utilisés, spécialement pour la luminescence des cristaux. J'ai dû me mettre au courant des techniques de purification (chromatographies, principalement) qui sont ici compliquées du fait de la fragilité des produits étudiés.

A cette époque, la formation des hydrocarbures cancérigènes dans la fumée de cigarette commençait à être étudiée d'une façon très poussée dans divers laboratoires étrangers. Utilisant des cigarettes françaises, je me suis intéressé à cette question. En particulier, la possibilité d'inhiber la formation de ces substances nocives a été examinée au cours de plusieurs années de recherches, sous la direction de M. LATARJET, en col-

laboration avec MM. CUZIN, HUBERT-HABART et ROYER. Les analyses ont porté sur la détection et le dosage d'une substance type particulièrement cancérigène et très fluorescente, le 3-4 benzopyrène.

Au cours de ces études, ayant eu connaissance des travaux concernant l'affinement des bandes de fluorescence par abaissement de la température des échantillons (CHPOLSKII, PESTEIL,...) j'ai pensé améliorer les techniques de détection et de dosage en refroidissant à -190°C les solutions à analyser. Ce procéder s'est révélé très efficace. Il m'a permis d'identifier le 3-4 benzopyrène dans la fumée de cigarette avec une grande certitude, ainsi que cela avait déjà été fait, peu de temps auparavant et indépendamment en URSS. Mon effort a porté principalement sur la recherche des conditions permettant d'utiliser quantitativement ce procédé. Il a abouti à la mise au point d'une technique de dosage qui permet de déterminer à 10% près la concentration du 3-4 benzopyrène dans des solutions complexes avec une spécificité, une sensibilité et une sélectivité très accrues par rapport aux techniques classiques. Cette méthode a été appliquée non seulement à la fumée de cigarettes, mais aussi à divers produits de consommation (eau, alcools distillés, ...)

Un autre problème, de caractère plus fondamental, étudié depuis longtemps dans notre Institut, est le mécanisme de l'action cancérigène des hydrocarbures. D'après de nombreux travaux théoriques et expérimentaux, il semble que la première étape de cette action soit la formation d'une liaison chimique entre l'hydrocarbure et les protéines ou nucléoprotéines cellulaires. L'étude expérimentale du phénomène pouvait bénéficier des possibilités apportées par la détection en spectrophotométrie de luminescence à basse température. Ces expériences, faites en collabo-

ration avec Mme DAUDEL, ont abouti, dans le cas du 3-4 benzopyrène, à détecter la partie hydrocarbonée du composé qui se forme "in vivo" par réaction de l'hydrocarbure et des protéines. L'allure du spectre observé renseigne sur le mode de liaison. Les résultats sont en accord avec les théories développées antérieurement dans notre Institut.

Dans la deuxième voie de recherche qui m'était proposée, j'ai surtout étudié l'état premier triplet des molécules aromatiques. En effet, pour un certain nombre d'hydrocarbures lourds, parmi lesquels se trouvent les plus puissants cancérigènes connus, la hauteur de ce niveau d'excitation n'avait pas encore été mesurée. La raison en est, semble-t-il, la faible intensité des rayonnements qui correspondent aux transitions du premier triplet à l'état fondamental et leur situation spectrale dans l'extrême rouge et le proche infrarouge. Ce domaine spectral était jusqu'alors négligé en luminescence, en raison du manque de sensibilité des récepteurs. J'ai pu mettre en évidence ces émissions à basse température avec un spectrophosphorimètre utilisant un monochromateur de grandes dimensions et un photomultiplicateur très sensible à l'infrarouge.

En plus de l'émission dûe aux transitions de l'état premier triplet à l'état fondamental, on enregistrait au phosphorimètre une émission à plus courtes longueurs d'ondes, dans la région spectrale de la fluorescence.

Pour le 3-4 benzopyrène, cette émission comporte un spectre semblable à celui de fluorescence. Ce phénomène, jamais décrit encore pour des solutions congelées (dans le cas de solvants n'absorbant pas le rayonnement d'excitation), a été trouvé par WILLIAMS dans les gaz. Il l'a attribué à la formation d'un dimère excité entre une molécule dans son

état fondamental et une molécule dans son état premier singulet. Ce dimère aurait une durée de vie assez longue, ce qui lui permettrait, après une durée de l'ordre de 10^{-3} s., de se décomposer en régénérant une molécule isolée excitée dans son état premier singulet.

Ici, cette interprétation ne semble pas convenir sans modification, puisque l'absorption de deux photons parait nécessaire à l'émission d'un seul photon de luminescence. Le dimère envisagé par WILLIAMS se formerait ici à partir de deux molécules de 3-4 benzopyrène excitées dans leur état premier triplet, emprisonnées dans une même maille du réseau formé par les molécules du solvant congelé. Ceci semble être confirmé par des expériences d'excitation de cette émission par des photons moins énergiques que les photons émis.

Dans le premier chapitre est présenté un historique succint des applications de la luminescence à l'étude des hydrocarbures cancérigènes et apparentés.

La partie de ce travail, à caractère fondamental, concernant les luminescences lentes, est présentée avant celle relative à la fluorescence, dont l'intérêt est surtout d'ordre pratique.

La nature du sujet traité nécessite qu'une attention particulière soit apportée aux détails expérimentaux, si bien qu'une grande partie du texte leur est réservée. Pour que l'essentiel des résultats et des discussions apparaisse plus clairement, ces points de détail ont été dactylographiés en simple interligne, ainsi que certaines parties très détaillées des discussions.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

En 1930, HIEGER (1) a étudié les spectres de fluorescence de goudrons et d'huiles qui provoquent des tumeurs malignes par application sur la peau d'animaux ainsi que l'avaient montré YAMAGIWA et ICHIKAWA (2), en 1916. Il remarqua, d'une part, que la fluorescence de tous ces produits était très intense et, d'autre part, que les produits les plus cancérigènes présentaient, en général, trois bandes de fluorescence, toujours aux mêmes longueurs d'ondes. HIEGER fit l'hypothèse que ces trois bandes étaient émises par le ou l'un des composés responsables du pouvoir cancérigène de ces produits.

Or, KENNAWAY (3) avait montré, en 1924, que les goudrons obtenus par pyrolyse de l'isoprène dans un courant d'hydrogène étaient fortement cancérigènes, ce qui démontrait que des composés ne comportant que du carbone et de l'hydrogène pouvaient provoquer le cancer.

On savait, d'autre part, que certains goudrons, obtenus par pyrolyse d'hydrocarbures aliphatiques, contiennent une grande proportion d'hydrocarbures aromatiques polycycliques qui distillent à des températures supérieures à 270° (4).

Comme BLOCH et DREIFUSS (5), en 1921, et KENNAWAY (6), en 1930, avaient montré que les fractions cancérigènes des goudrons distillaient à plus de 300°, HIEGER et KENNEWAY (1)(6), supposèrent que l'activité cancérigène des goudrons était due à des hydrocarbures aromatiques polycycli-

ques. Pour sélectionner les composés à badigeonner sur la peau de souris, HIEGER enregistrait leur spectre de fluorescence et retenait les composés dont le spectre de fluorescence était le plus proche de celui rencontré pour les goudrons cancérigènes. Comme ce spectre est très semblable, à un déplacement bathochrome près, à celui du 1-2 benzanthracène, leur choix se porta principalement sur les dérivés de ce composé.

C'est ainsi qu'ils découvrirent l'activité cancérigène d'un dibenzanthracène, et par la suite de nombreux autres hydrocarbures aromatiques.

COOK, HEWETT et HIEGER (7), en 1932, procédèrent à un fractionnement du goudron de houille. Ils enregistraient les spectres de fluorescence des diverses fractions et récupéraient toujours les fractions pour lesquelles les trois bandes de fluorescence précédemment signalées se manifestaient le plus nettement. Ils aboutirent à l'isolement d'un composé très fluorescent et dont l'activité cancérigène dépasse de beaucoup celle des goudrons les plus actifs. Ils identifièrent cette substance au 3-4 benzopyrène.

L'exposé des travaux qui viennent d'être cités montre combien le rôle de la spectroscopie de fluorescence a été important dans la découverte des substances pures cancérigènes.

Depuis cette époque, la spectroscopie de luminescence n'a cessée d'être utilisée pour la détection des substances douées de pouvoir oncogène, ainsi que des substances apparentées.

On peut citer la détection dans l'atmosphère des villes (8,9), dans la fumée de cigarette (10), dans les produits d'échappement des moteurs à explosion (11).

L'étude du métabolisme des hydrocarbures aromatiques a bénéficié des possibilités de la détection par spectrophotométrie de luminescence. WEIGERT (12) a détecté et identifié des métabolites du 3-4 benzopyrène, par fluorescence et absorption.

En particulier, on a étudié par fluorescence le phénomène suggéré par les théories de DAUDEL (13) et PULLMAN (14), de la formation d'une liaison chimique entre les hydrocarbures cancérigènes et certaines substances cellulaires (15). TARBELL (16) chercha à identifier l'un des produits hydrocarbonnés qui résultent de cette liaison, dans le cas du 3-4 benzopyrène.

Les techniques de détection ont subi des améliorations à partir de celle utilisée par HIEGER. On peut signaler, tout d'abord, l'utilisation d'un monochromateur pour l'excitation. Cette technique permet d'exciter la substance recherchée dans une région spectrale restreinte, centrée sur un maximum d'absorption, ce qui accroit la sélectivité (17). L'abaissement de la température, associé à l'utilisation de certains solvants, procure un affinement considérable des bandes de fluorescence de certaines substances, donc un accroissement de la sélectivité, de la spécificité et de la sensibilité de la détection (18). La détection par fluorescence à la température ambiante peut être quantitative, grâce à certaines précautions (19).

Le fait que la plupart des composés cancérigènes sont photoluminescents a conduit certains auteurs à rechercher si cette propriété n'a pas un rapport avec leur activité biologique.

BRUCE (20) rechercha si, dans une série de substances de structure assez proche, les composés les plus cancérigènes sont ceux qui ont la

plus grande intensité de fluorescence. Utilisant les dérivés du cholanthrène, il montra qu'il n'en est rien.

La même constatation s'impose si l'on compare le rendement de fluorescence d'un certain nombre d'hydrocarbures aromatiques d'activité cancérigène différente (21, 22).

SCHOENTAL et SCOTT (23) ont enregistré le spectre de fluorescence de solutions d'un grand nombre d'hydrocarbures aromatiques. Ils ne signalent aucune corrélation avec l'activité cancérigène.

MOODIE et REID (24) ont remarqué une corrélation, pour les dérivés substitués du 1-2 benzanthracène et du 3-4 benzophénanthrène, entre le sens et la grandeur du déplacement des spectres de luminescence T _ S, dûs à la méthylation, et l'activité cancérigène. Mais cette corrélation n'est pas très nette et d'autre part nous n'avons pas retrouvé, nous même, de corrélation semblable pour les dérivés méthylés d'autres hydrocarbures.

Une éventuelle corrélation entre la hauteur d'un niveau d'excitation, donnée par la situation d'un spectre de luminescence, et l'activité cancérigène, pourrait provenir d'une intervention de l'état excité considéré, dans le processus conduisant à la cancérisation, par l'intermédiaire de phénomènes tels que les transferts d'énergie ou d'électrons.

C'est dans ce sens que BIRKS (25) a interprété une corrélation qu'il a remarquée entre la hauteur du premier singulet et l'activité cancérigène des hydrocarbures aromatiques, en examinant les résultats de SCHOENTAL et SCOTT (23), Une condition nécessaire pour qu'un hydrocarbure soit cancérigène serait qu'il ait son niveau premier singulet dans la région 24 000 - 26 000 cm^{-1}. Nous avons cependant relevé des exceptions

importantes à cette règle puisque les hydrocarbures suivants, dont nous donnons la hauteur du premier singulet (nombre d'onde de la bande de fluorescence intense de plus grande fréquence) sont cancérigènes : 1-2-5-6 dibenzofluorène (27800 cm^{-1}) (22), 3-4-9-10 dibenzopyrène (23150 cm^{-1}) (*), 3-4-8-9 dibenz o pyrène (22300 cm^{-1}) (23), 10-monométhyl 3-4-8-9 dibenz o pyrène (21800 cm^{-1}) (*), 6-12 diméthyl anthanthrène (22400 cm^{-1}) (*).

La raison d'une telle corrélation serait, selon BIRKS, que les modifications devant conduire à la cancérisation par ces substances résulteraient de transferts d'énergie (du type de FÖRSTER) d'un constituant des cellules vivantes à ces hydrocarbures. Dans ces conditions, le rendement de ces transferts dépendrait de l'importance du recouvrement du spectre de fluorescence du donneur d'énergie et du spectre d'absorption de la substance réceptrice d'énergie. BIRKS a évalué les intégrales de recouvrement, en prenant comme exemple de donneur d'énergie le tryptophane, dont le spectre de fluorescence est connu. Il obtient alors une bonne corrélation entre l'importance du recouvrement de ce spectre avec le spectre d'absorption de 10 hydrocarbures et leur pouvoir cancérigène.

MASON (26) a élaboré une théorie cherchant à prévoir l'activité cancérigène des hydrocarbures aromatiques, à partir des hauteurs de leurs niveaux d'excitation successifs. Pour que les hydrocarbures soient cancérigènes, il faudrait que l'énergie de l'un de leurs niveaux d'excitation soit égale à celle séparant les deux bandes pleines de plus haute énergie des protéines considérées comme des semi-conducteurs. Des transferts d'électrons d'une protéine à l'hydrocarbure seraient alors possibles, à

(*) mesures personnelles.

la condition que les molécules de l'hydrocarbure soient proches des molécules de protéines. MASON imagine que ce sont ces transferts d'électrons, rendant les protéines conductrices, qui entraîneraient la cancérisation des cellules. Cette théorie semble aussi s'appliquer correctement, non seulement aux hydrocarbures mais aussi à certains hétérocycles (27).

Il est probablement trop tôt pour conclure dans ce domaine, puisque le nombre de composés examinés semble encore trop restreint et que les corrélations trouvées ne sont qu'approximatives. Ces théories sont cependant intéressantes, en ce sens qu'elles peuvent suggérer des expériences qui pourraient éclaircir la compréhension des phénomènes. D'autre part, on peut rendre compte d'une façon assez complète de l'activité cancérigène des hydrocarbures aromatiques par la théorie proposée par CHALVET et DAUDEL (28) et qui dérive de celles de DAUDEL (13) et PULLMAN (14).

L'apparition du pouvoir cancérigène chez une substance résulte probablement d'un grand nombre de conditions; c'est donc une étude approfondie de toutes les propriétés des substances cancérigènes et apparentées qui pourra amener une explication complète de leur activité biologique. C'est pourquoi, sans trop nous préoccuper de donner une explication au pouvoir cancérigène, nous avons, dans cette thèse, étudié certaines propriétés des hydrocarbures aromatiques : hauteur du niveau premier triplet, phénomène de fluorescence retardée.

L'historique de ces questions particulières ainsi que celui relatif à la détection et au dosage seront présentés dans les chapitres où ces sujets seront traités.

CHAPITRE II

APPAREILLAGE TECHNIQUES ET NOMENCLATURE

I - APPAREILLAGE

L'appareillage que nous avons utilisé est de type classique, mais nous l'avons monté nous-même à partir d'éléments soit disponibles dans le commerce soit réalisés spécialement.

Une étude minutieuse des caractéristiques de cet appareillage a été faite, afin de définir les différents paramètres qui interviennent dans nos mesures.

Pour la spectrophotométrie de luminescence, les différents montages possibles pouvaient être classés en deux principaux types, présentant chacun leurs avantages et leurs inconvénients, et entre lesquels en pratique il fallait choisir. Il s'agit de la détection photoélectrique ou de la détection photographique des spectres.

Nous avons été orientés vers la première solution, en partie parce que nous disposions au laboratoire de deux gros monochromateurs doubles de très bonne qualité. L'un de ces monochromateurs, réalisé par l'Institut d'Optique, présente une caractéristique intéressante et très rarement réalisée pour des monochromateurs utilisables dans l'ultraviolet : il est monté avec des pièces optiques de grandes dimensions, ce qui lui confère à la résolvance égale, une luminosité supérieure aux appareils commerciaux.

D'autre part, les progrès récents des photomultiplicateurs permettent d'obtenir une sensibilité du même ordre que celle des plaques photographiques, en des temps plus courts.

Nous examinerons succintement les avantages respectifs des spectromètres et des spectrographes dans le cas de l'étude des spectres de luminescence.

Les principaux avantages des spectrographes sont les suivants :

a) grande précision des pointés en longueur d'onde, puisqu'ils ne comportent pas de pièces mobiles risquant d'apporter des erreurs en longueur d'onde, dûes aux imperfections du mécanisme.

b) Enregistrement simultané de tous les éléments spectraux. Lorsque l'échantillon étudié est très luminescent, cet enregistrement peut être fait en un temps relativement court.

c) Plus grande précision dans la forme des spectres et détection plus aisée de petits accidents : en effet, comme l'enregistrement de tous les éléments spectraux est simultané, les instabilités de la lampe excitatrice n'ont aucune influence sur la précision avec laquelle les rapports des éclairements aux différents points de la plaque sont connus. D'autre part le "bruit de photons" doit être moins élevé que pour l'enregistrement photoélectrique, puisqu'il faut un grand nombre de grains noircis, par unité de surface, pour rendre le noircissement de la plaque perceptible.

Toutes ces qualités sont surtout intéressantes quand on étudie les structures fines de spectres comportant un très grand nombre de raies. C'est par exemple le cas de l'étude des spectres de luminescence à 20° K ou à 4° K, pour leur interprétation vibrationnelle.

Les avantages de la détection photoélectrique sont les suivants :

a) Réponse quasi-instantanée à une longueur d'onde donnée, même pour les luminescences très faibles :

Si on ne s'intéresse qu'à quelques points du spectre, ce qui est le cas dans les détections et les dosages par luminescence, l'enregistrement ne dure que quelques secondes. Pour la détection, cet avantage est particulièrement important, puisqu'il permet de faire un grand nombre de vérifications très rapidement : par exemple vérification de la propreté de la verrerie, localisation de certains produits au cours d'un fractionnement.

De même, l'allure générale d'un spectre peut être connue très rapidement (quelques minutes); le temps d'enregistrement d'un spectre comportant un grand nombre de bandes aiguës ne dépasse pas, en général, une demi-heure.

Lorsqu'on est en présence de substances très photosensibles et peu luminescentes, la diminution du temps d'enregistrement apportée par l'enregistrement direct est capitale, et dans ce cas c'est la seule méthode possible quand on ne possède pas une grande quantité du matériel à examiner, de façon à pouvoir renouveler l'échantillon après un certain temps d'irradiation.

b) Plus grande souplesse de l'appareil : Celui-ci peut fonctionner dans les meilleurs conditions de luminosité, quelle que soit la résolvance demandée (en dessous de la résolvance maximale), par simple changement des largeurs de fentes, alors qu'en spectrographie il faut changer l'objectif de chambre, quand on change de résolvance, pour obtenir l'éclairement maximal de la plaque compatible avec cette résolvance. Cet avantage est précieux quand on s'intéresse à plusieurs problèmes différents nécessitant des résolvances variées (par exemple, luminescence à basse température et à la température ordinaire, détection de petites quantités de produits divers différant par

la largeur de leurs bandes de luminescence).

c) Une fois déterminée la courbe spectrale de sensibilité à énergies égales du spectrophotomètre, on peut relativement aisément calculer la répartition spectrale du flux d'énergie du rayonnement de luminescence, quantité beaucoup plus difficile à obtenir en spectrophotométrie photographique.

Comme nous étions intéressés à la fois par des problèmes d'analyse qualitative et quantitative et par l'étude des niveaux d'énergie d'excitation, la détection photoélectrique était la plus indiquée.

A/ - MONOCHROMATEURS

1° - Description

Deux monochromateurs à prismes et à miroirs ont été utilisés : l'un, pour le visible, a été décrit en détail par TERRIEN (29) (figure 1), L'autre, pour l'ultraviolet, a été décrit par WIHLM (30); il est d'un type très semblable.

On peut noter les caractères suivants, qui ont un intérêt spécial pour les études de luminescence :

a) Leurs pièces d'optique sont de grandes dimensions.

Les prismes du monochromateur pour le visible ont 10 cm de haut et une base de 10 cm de côté. Les prismes en quartz naturel du monochromateur pour l'ultraviolet ont 13,5 cm de haut et une base de 13,5 cm de côté.

Il est connu que, à résolvances égales, la luminosité d'un monochromateur croit comme le carré des dimensions des prismes, si les dimensions des sources sont assez grandes pour permettre au faisceau à analyser de couvrir entièrement les prismes et la fente d'entrée. Or cette dernière condition est le plus souvent réalisée ici.

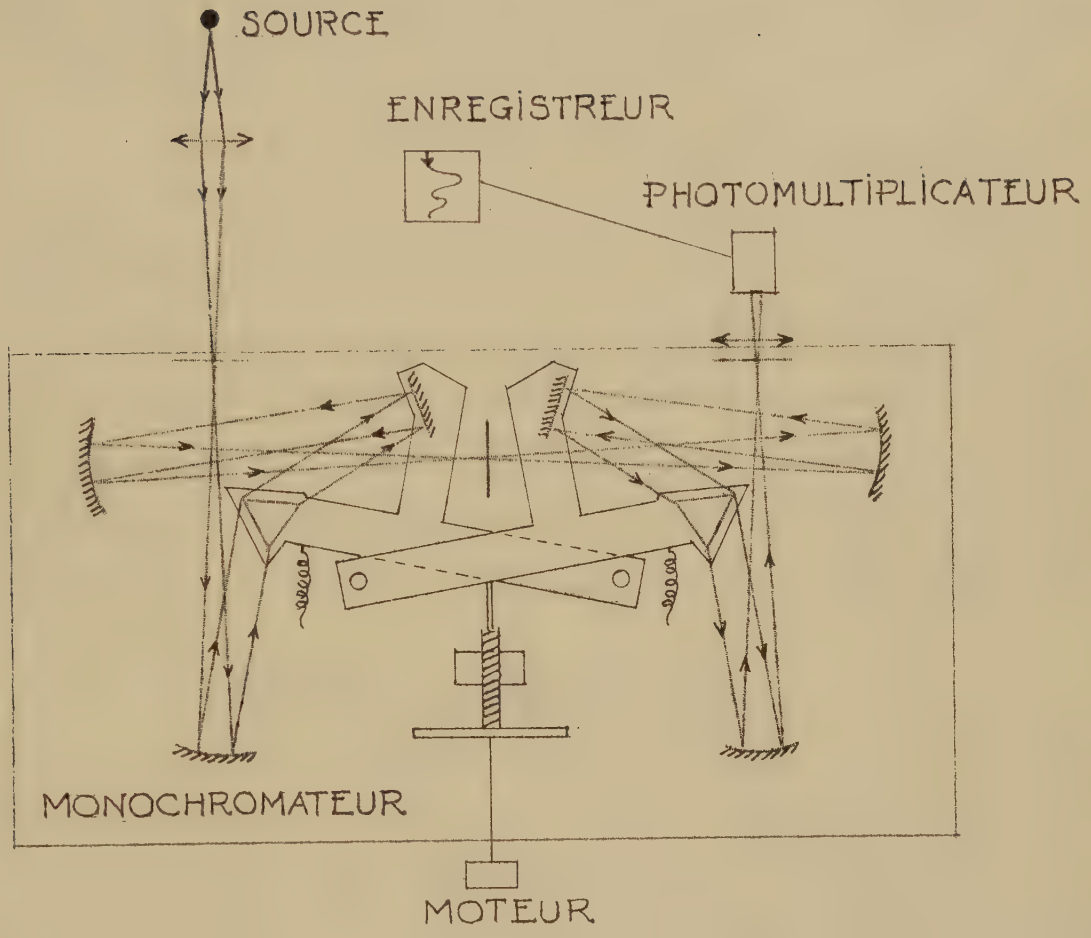
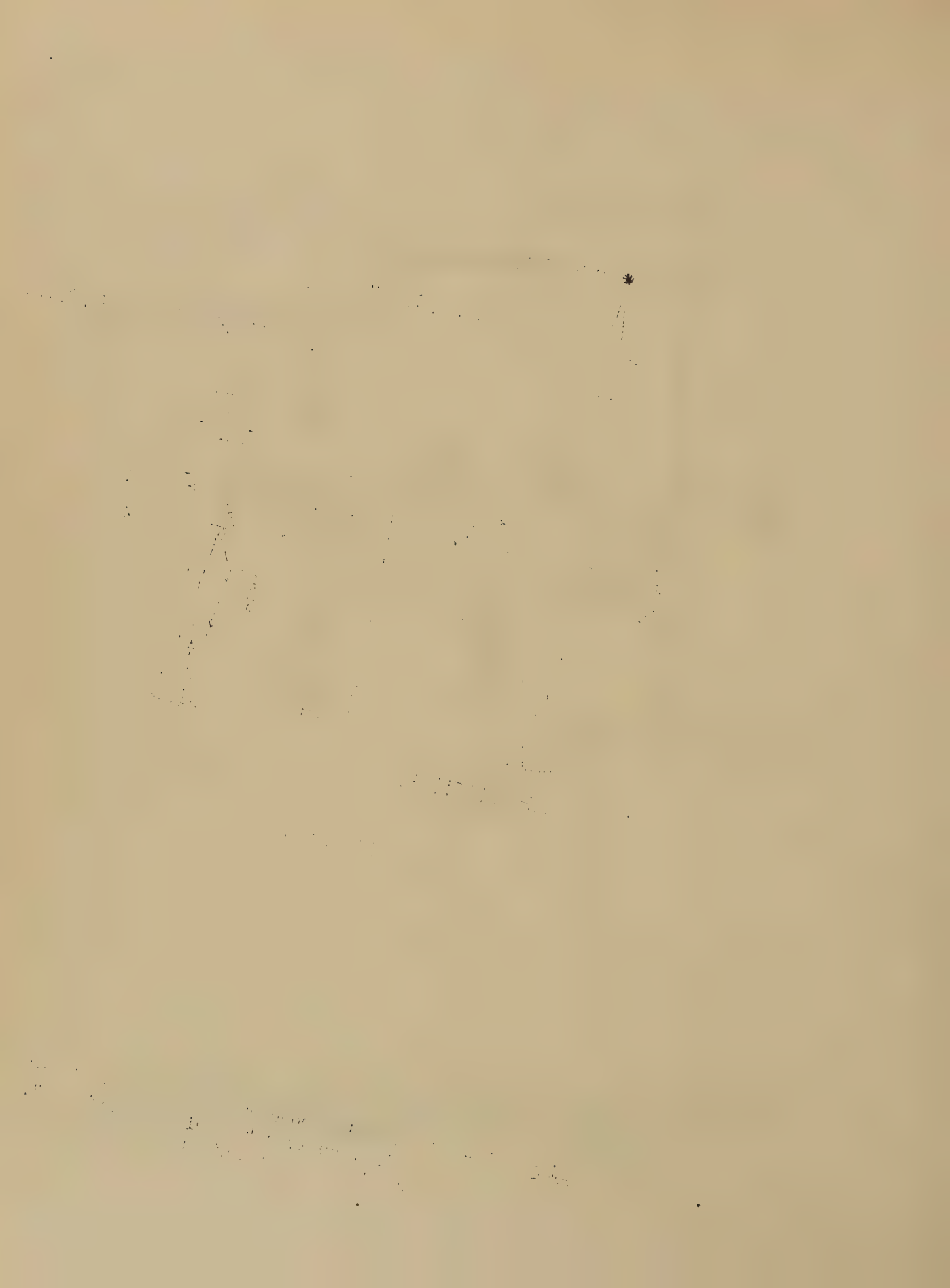


Figure 1 - Schéma d'un monochromateur double à prismes et à miroirs, de type "Terrien et Desvignes", et montage pour l'enregistrement photoélectrique du spectre d'une source.



En effet, les échantillons ne peuvent être commodément plus petits que 2 mm. de large et 2 cm. de haut, et les fentes sont en général ouvertes à moins de 6 mm. de façon à avoir des largeurs de bandes inférieures à 100 A., il suffit donc de projeter une image de l'échantillon agrandie 3 fois environ sur la fente d'entrée, à l'aide d'une lentille ouverte au moins à F/2 pour couvrir à la fois la fente d'entrée (hauteur = 5 cm.) et le prisme, puisque ces monochromateurs sont ouverts à environ F/8.

b) Ces monochromateurs sont doubles (de type soustractif), ce qui est un avantage sérieux pour la fluorescence, principalement à basse température où les échantillons sont très diffusants; en effet, on n'est jamais gêné par le flux très intense de lumière excitatrice pénétrant dans le monochromateur à la suite de sa diffusion par l'échantillon, puisque le taux d'impuretés à la fente de sortie est extrêmement faible. D'autre part, on peut étudier pour un échantillon donné diverses régions spectrales pour lesquelles les intensités de luminescence émise sont très différentes.

2° - Caractéristiques Photométriques

Les caractéristiques photométriques de ces monochromateurs ont été soigneusement étudiées, puisqu'elles nous étaient indispensables pour le calcul des courbes spectrales d'énergie des rayonnements de luminescence. D'autre part, elles permettaient de se rendre compte des possibilités de ces monochromateurs.

a) Transmission :

Les courbes de transmission monochromatique des deux monochromateurs sont reproduites sur la figure 2.

On peut remarquer pour le monochromateur à prismes de verre une baisse très importante de la transmission aux longueurs d'ondes inférieures à 3900 A. Cette baisse de transmission est dûe à l'absorption très forte des prismes de flint à ces longueurs d'onde et elle diminue les qualités du mono-

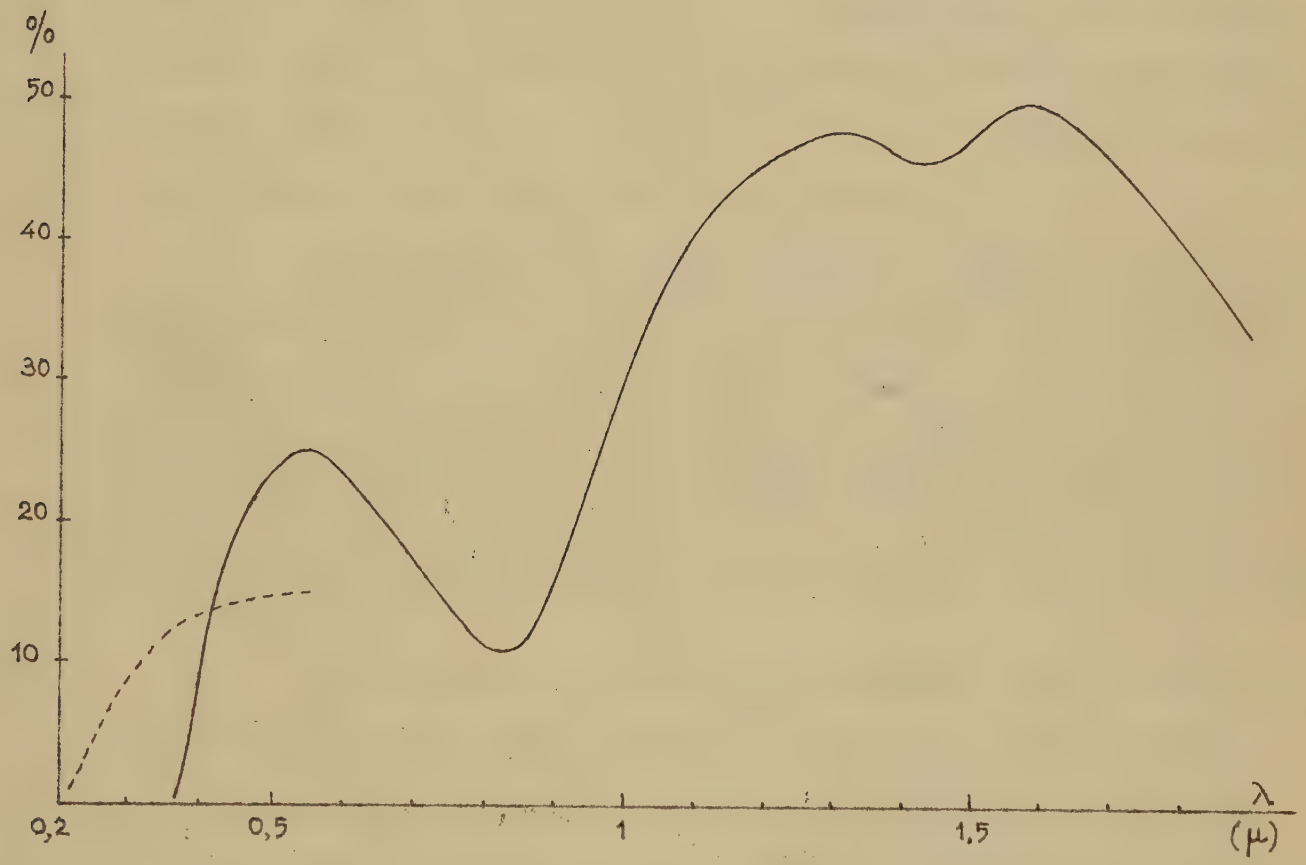


Figure 2 : Courbes spectrales de transmission monochromatique des monochromateurs

----- Monochromateur à prismes de quartz

——— Monochromateur à prismes de verre

chromateur dans cette région spectrale. On note un maximum de 25% dans le visible et de 50% dans l'infrarouge.

Pour le monochromateur à prismes de quartz, on constate une baisse assez prononcée de la transmission pour les longueurs inférieures à 2500 A. WIHLM (30) a montré que cette baisse était principalement due à l'absorption par les miroirs aluminés. Cette influence des aluminures, qui est considérable car la lumière est réfléchie 8 fois avant de sortir du monochromateur, méritait donc d'être étudiée de plus près.

Nous avons constaté que la transmission diminuait au cours du temps si on ne plaçait pas de desséchant dans l'enceinte du monochromateur et, par exemple, tombait à moins de 1% à des longueurs d'ondes inférieures à 3000 A, au bout d'un an. En présence de desséchant, la transparence du monochromateur est pratiquement conservée plus de 1 an. Des mesures de comparaison de pouvoir réflecteur de miroirs de différents origines nous ont montré nettement que ce sont les miroirs dont la couche d'aluminium n'est pas recouverte par un dépôt protecteur transparent qui donnent les meilleurs résultats dans l'ultraviolet. Après 11 mois de conservation au sec, un miroir non protégé possède à peu près le même pouvoir réflecteur que le meilleur des miroirs protégés étudiés conservés seulement 3 mois dans les mêmes conditions (fig. 3).

D'autre part, si le maximum de transmission dans le visible est de 25% avec le monochromateur à prismes de verre, il n'est que de 15% avec le monochromateur à prismes de quartz. Ceci est probablement dû à ce que les prismes de quartz ne sont pas aussi homogènes que les prismes de verre, et qu'ils comportent des défauts qui absorbent et diffusent la lumière.

Cette explication est confirmée par la comparaison de la transmission d'une des moitiés du monochromateur pour l'ultraviolet équipée d'une part avec son prisme de quartz naturel et d'autre part avec un prisme de "Suprasil" de mêmes dimensions, prêté par les Etablissements "Electro-Quartz". Les courbes de transmission obtenues dans ces deux cas sont représentées sur la figure 4. On constate qu'avec la silice fondue "Suprasil", plus homogène que le quartz naturel, la transmission atteint 50% dans le visible alors qu'elle n'est que de 36% avec le quartz. Dans l'ultraviolet de 2300 A à 4000 A, on enregistre un gain analogue et constant (de l'ordre de 1,4) avec le prisme en "Suprasil", ce qui confirme qu'il s'agit d'une absorption ou d'une diffusion non sélective par le prisme de quartz. Aux longueurs d'onde inférieures à 2300 A, le gain donné par l'utilisation du prisme de "Suprasil" devient beaucoup plus important, et il est de l'ordre de 10 à

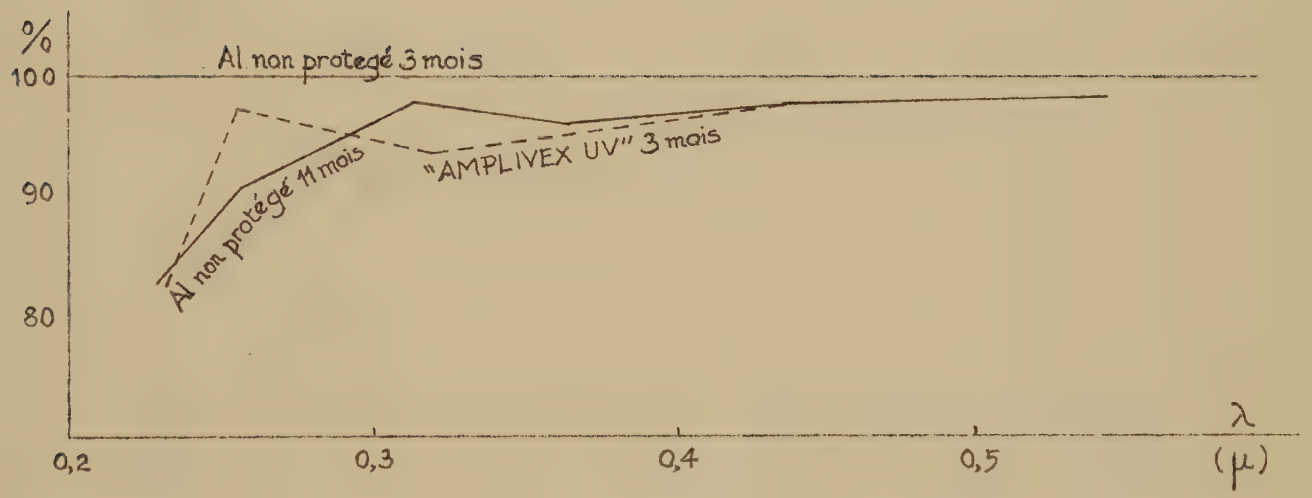


Figure 3 - Facteurs de réflexion monochromatique de miroirs aluminés.

En ordonnées : rapport des facteurs de réflexion aux facteurs de réflexion d'un miroir non protégé conservé 3 mois.

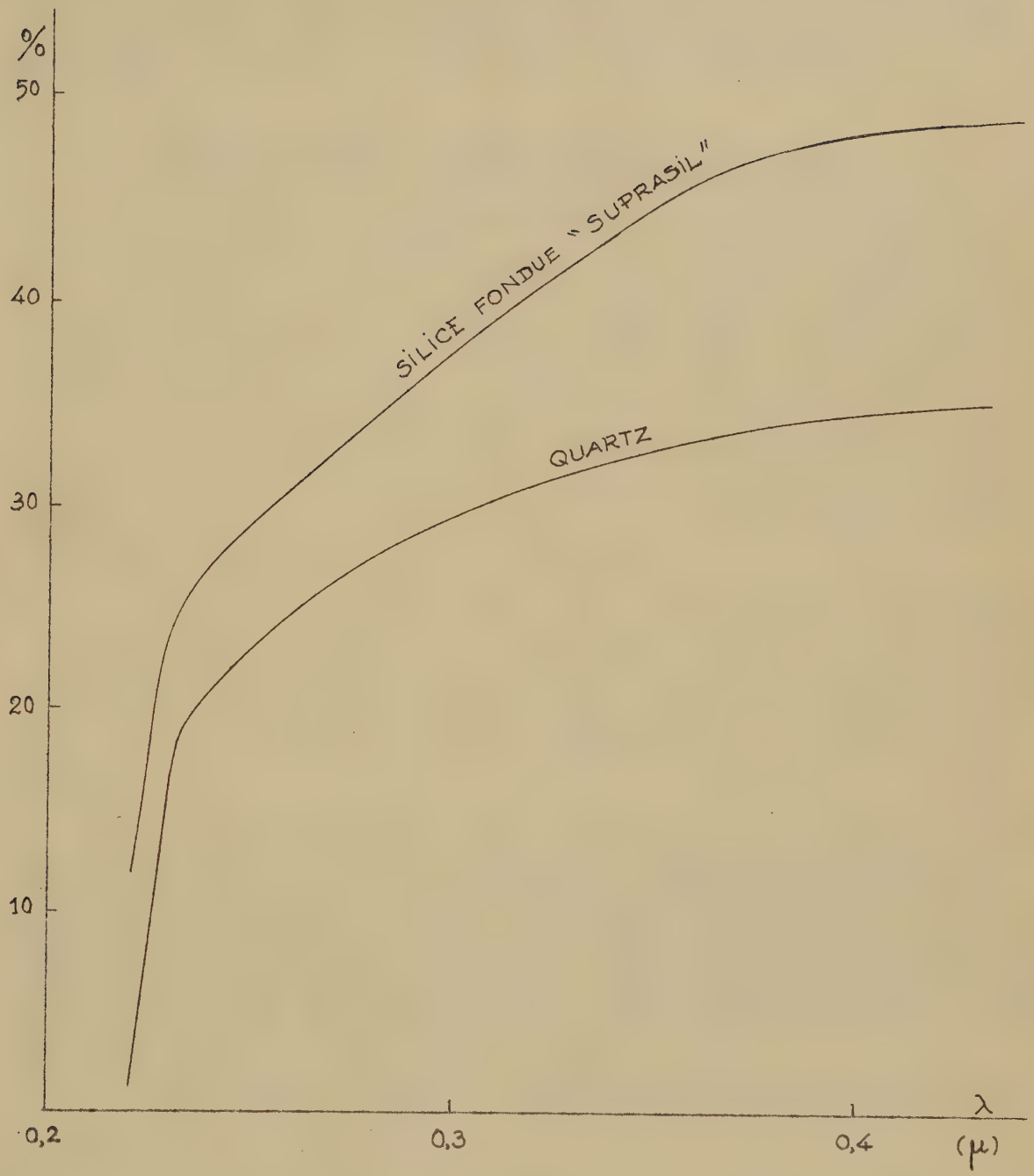


Figure 4 - Courbes spectrales de transmission monochromatique d'une des moitiés du monochromateur double pour l'ultra-violet, équipée d'une part d'un prisme de quartz naturel, d'autre part d'un prisme de silice fondue de qualité "SUPRASIL".

2200 A, ce qui montre que le quartz naturel absorbe sélectivement ces longueurs d'ondes. On aurait donc avantage à remplacer les deux prismes de quartz par deux prismes de "Suprasil". Cette modification n'a pas encore été faite en raison du prix très élevé de pièces de "Suprasil" de grandes dimensions.

b) Dispersion, largeur de bande, pouvoir de résolution :

Les dispersions linéaires des deux appareils ont été données par TERRIEN (29) et WIHLM (30). On peut voir que dans le visible, les dispersions sont pratiquement les mêmes (25 A/mm à 4000 A). Comme leurs ouvertures relatives sont peu différentes (F/7,7 pour le monochromateur à prismes de quartz, et F/9 pour celui à prismes de verre); les flux utiles admis dans les deux monochromateurs, pour des hauteurs de fentes égales et des résolvances égales, sont du même ordre.

Quand on cherche à séparer des raies très voisines, les résultats obtenus dans le visible sont meilleurs avec le monochromateur à prismes de verre, en utilisant des fentes très fines et de hauteur assez réduite.

Ceci est dû à ce que les aberrations qui ne dépendent pas de la hauteur des fentes sont plus faibles pour le second appareil, en partie parce que le montage adopté dans ce dernier annule la coma et en partie parce que la dispersion angulaire d'un prisme de flint à 4000 A est plus forte que celle d'un prisme de quartz de mêmes dimensions. Par exemple, à 4000 A, les aberrations pour des hauteurs de fentes très petites augmentent la largeur de bande "à mi-hauteur" de 5 A pour le monochromateur à prismes de quartz et de 0,5 A pour l'autre appareil (29, 30).

Nous donnerons quelques exemples du pouvoir de résolution expérimental que l'on peut obtenir :

Avec le monochromateur à prismes de verre et une lampe à vapeur de mercure, cadmium et zinc de chez "Osram", on sépare la raie 4678,2 A du cadmium de la raie 4680,2 A du Zinc, bien que la raie du cadmium soit 5 fois plus forte que celle du Zinc. A 3700 A, on sépare aisément avec ce monochromateur des raies distantes de 1 A.

Nous n'avons pas eu l'occasion de déterminer expérimentalement la limite de résolution du monochromateur à prismes de quartz dans l'ultra-

(inférieur à 10^{-8} Amp. pour un gain de 10^7 fois, s'il est monté dans une enceinte sèche). La petite valeur de ce courant d'obscurité est vraisemblablement due en partie aux dimensions réduites de la photocathode, qui n'est que de 1 cm. de diamètre. Ce petit diamètre de la cathode n'est pas gênant pour nous, puisque nous pouvons projeter sur la photocathode une image du prisme inférieure au diamètre de celle-ci.

b) Pour la détection des rayonnements ultraviolets, nous avons utilisé un photomultiplicateur à 20 étages, construit à l'Observatoire de Paris dans le Service de M. LALLEMAND. Ici aussi, le courant d'obscurité est très faible, bien qu'un peu supérieur à celui de l'EMI, dans des conditions donnant des réponses identiques à 4000 A. Mais la photocathode du photomultiplicateur de LALLEMAND a une surface bien plus grande.

Le diamètre de la fenêtre de l'enceinte dans laquelle ce photomultiplicateur nous a été fourni, est de 2 cm. de diamètre. Or, la hauteur des fentes du monochromateur pour l'ultraviolet est de 5 cm. Pour que tout le rayonnement sortant du monochromateur atteigne la photocathode, une lentille de quartz de plus de 5 cm de diamètre a été placée à la fente de sortie du monochromateur. Cette lentille projette une image du prisme de 1,8 cm de côté sur la fenêtre du photomultiplicateur; le faisceau diverge ensuite un peu à l'intérieur de l'enceinte du photomultiplicateur mais ne déborde pas de la surface utile de la photocathode.

c) Les rayonnements dans l'extrême rouge et le proche infra-rouge ont été détectés par un autre photomultiplicateur de LALLEMAND, à 11 étages, très sensible dans cette région spectrale. Le courant d'obscurité, à la température du laboratoire, donné par les photocathodes sensibles à l'infrarouge, est assez élevé. Pour améliorer les performances du photomultiplicateur, on est amené à le refroidir par de la glace carbonique, ce qui diminue très fortement le courant d'obscurité. Il devient alors si faible qu'il n'est plus possible de le détecter avec un galvanomètre. On peut donc gagner en sensibilité en amplifiant le courant débité jusqu'à ce qu'apparaissent très nettement les fluctuations du courant d'obscurité (figure 5).

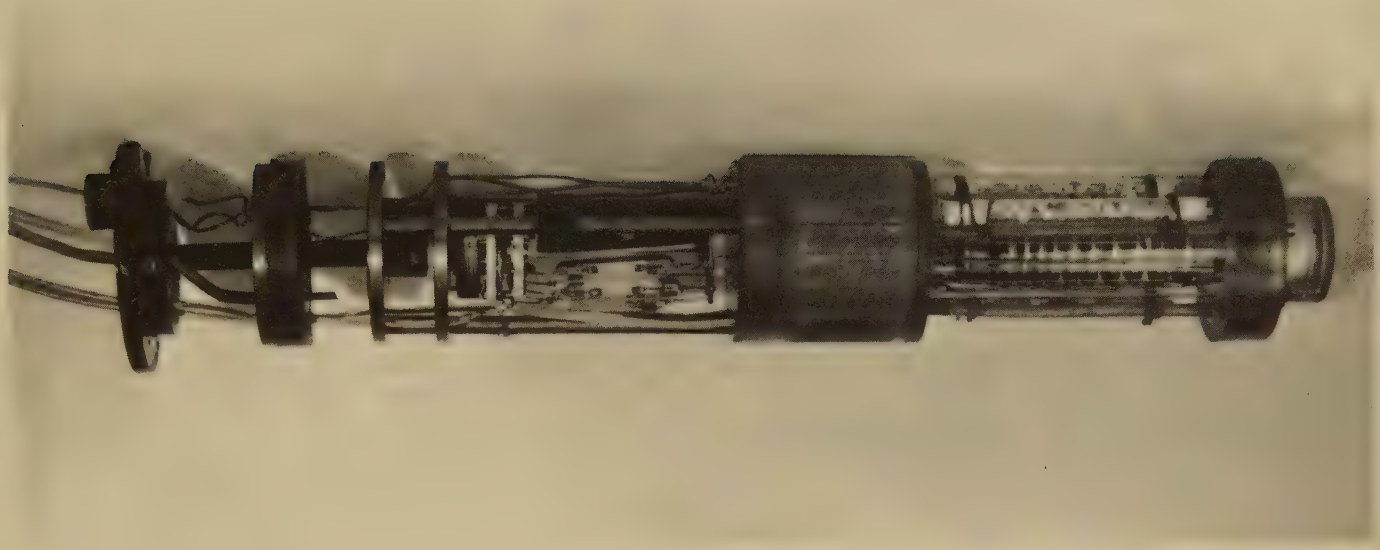


Figure 5 : Photomultiplicateur Lallemand, sensible à l'infrarouge et montage électronique intérieur au boîtier de refroidissement.

Le montage nous a été indiqué par M. LALLEMAND (*). Nous y avons apporté quelques modifications pour l'adapter à notre problème. Un schéma en coupe de ce montage est représenté sur la figure 6. L'amplificateur à courant continu et la lampe électromètre (ET3) est placée dans l'enceinte refroidie, ce qui affaiblit son courant de grille et diminue la longueur de la connection avec le photomultiplicateur et donc les risques de courants parasites. La lampe électromètre doit être placée dans une petite enceinte étanche à la lumière pour éviter l'éclairement de la cathode du photomultiplicateur par le filament. La principale difficulté est d'éviter la rentrée d'air humide, due à la contraction de l'air de l'enceinte au cours du refroidissement. Toute rentrée d'humidité dans le boitier provoque une diminution de l'isolement entre la haute tension et la grille de la lampe électromètre, ce qui apporte des instabilités considérables. Une étanchéité relative est assurée par l'utilisation de joints en caoutchouc aux silicones, qui durcit peu au refroidissement. Cette étanchéité serait insuffisante si l'on ne mettait pas en relation l'enceinte avec une cartouche de desséchant (respirateur) qui permet la rentrée d'air sec dans l'enceinte de façon à y maintenir la pression atmosphérique. On peut même communiquer une légère surpression à l'intérieur de l'enceinte par l'intermédiaire de la cartouche de désséchant, ce qui diminue encore les risques de rentrée d'air humide par les microfuites résiduelles. Pour éviter le givrage de la fenêtre optique, on réchauffe celle-ci en chauffant la pièce métallique qui la maintient; cette fenêtre devait être assez grande pour permettre le passage des rayons lumineux provenant de la lentille placée à la fente de sortie du monochromateur (lentille projetant l'image du prisme sur la photocathode), elle avait donc tendance à givrer en son centre. L'addition d'une deuxième fenêtre, séparée de la première par un joint torique, évite cet inconvénient, à condition cependant de percer une très petite ouverture dans la fenêtre intérieure ce qui assèche l'espace séparant les deux fenêtres et empêche l'humidité de se condenser sur la surface externe de la fenêtre interne.

2° - Courbes spectrales de sensibilités à énergies égales.

Sur la figure 7 sont représentées les courbes spectrales de sensibilités relatives des trois photomultiplicateurs, le maximum étant pris égal à 100 pour chaque photomultiplicateur. Elles ont été obtenues par comparaison avec une thermopile. Pour les mesures au photomultiplicateur, le flux lumineux était affaibli par réflexion diffuse sur un bloc de carbonate de calcium enfumé de magnésie, dont la réflexion n'est pratiquement pas sélective entre 2400 et 12000 A (31,32), ou le photomultiplicateur était utilisé avec seulement un ou quelques étages.

La sensibilité absolue, minimum de flux décelable, du photomultiplicateur pour l'infrarouge est, dans le visible, beaucoup moins bonne que

(*) Nous tenons à remercier M. LALLEMAND pour tous les renseignements qu'il a bien voulu nous communiquer.

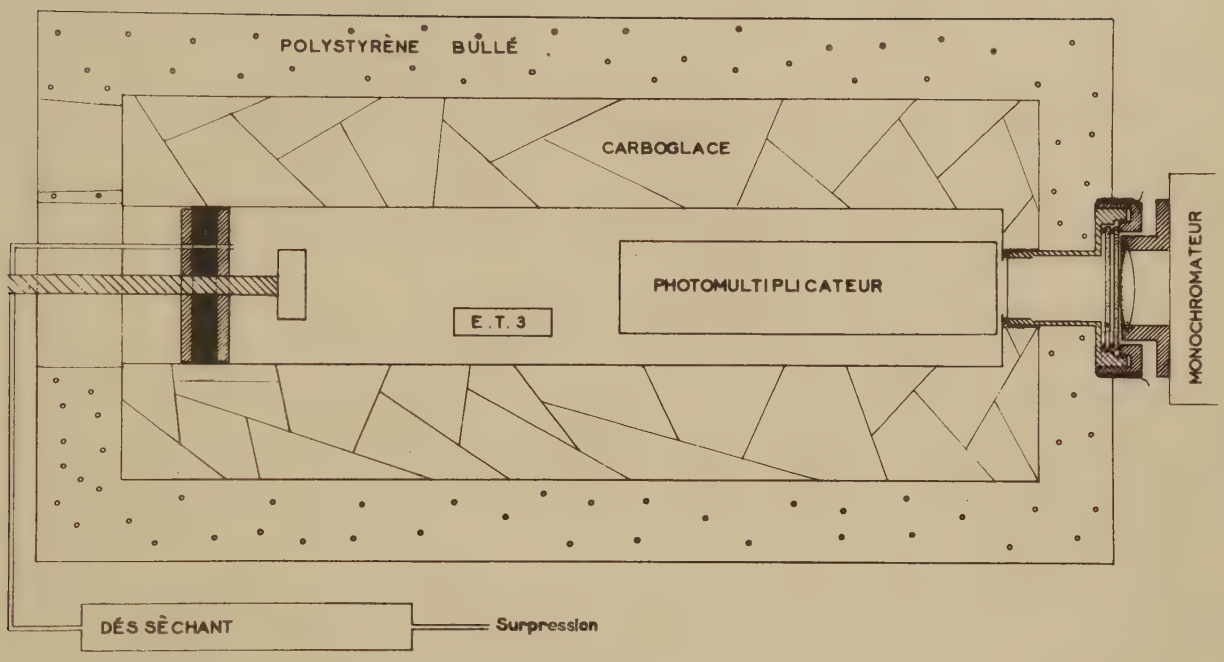


Figure 6 : Boîte de refroidissement du photomultiplicateur Lallemand sensible à l'infrarouge.

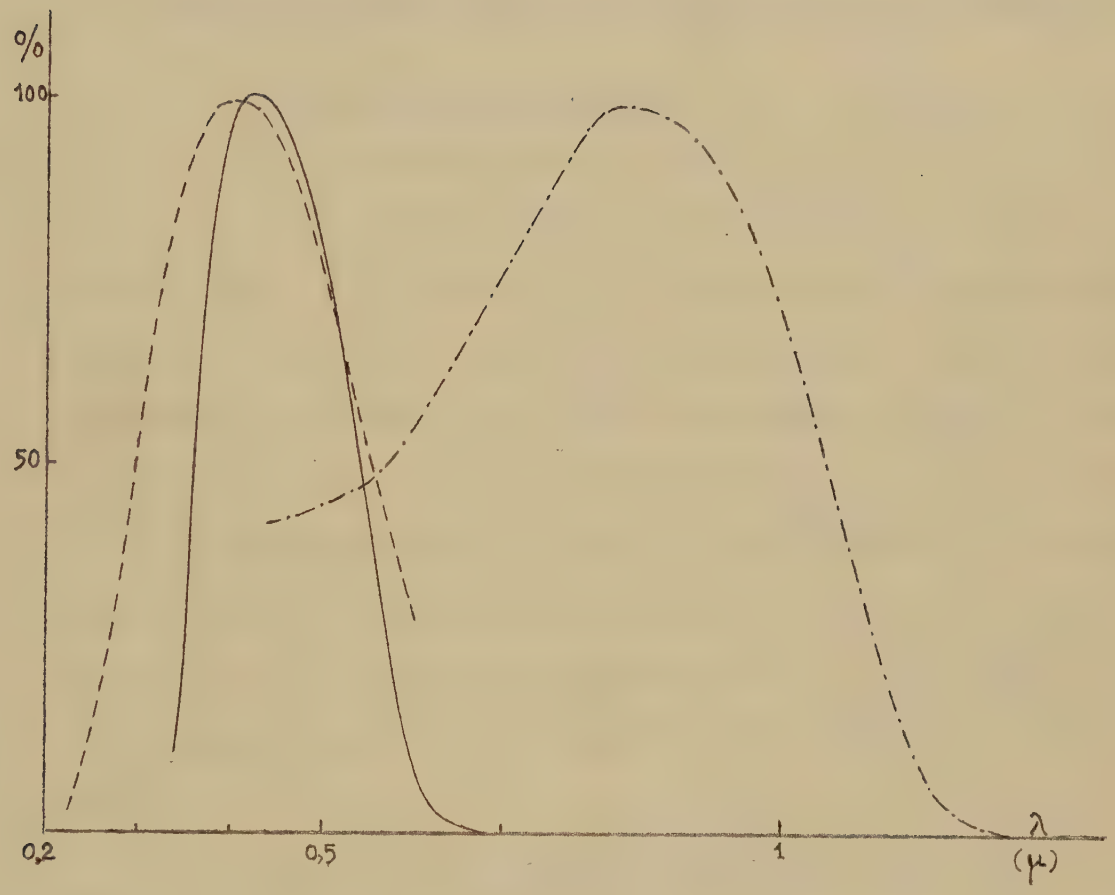


Figure 7 - Courbes spectrales de sensibilités relatives à énergies égales des trois photomultiplicateurs.

(Les ordonnées des maxima sont arbitrairement pris égaux à 100)

– – – – – Photomultiplicateur Lallemand sensible à l'ultraviolet

———— Photomultiplicateur EMI 6685 B

—·—·—·— Photomultiplicateur Lallemand sensible à l'infrarouge

celle des deux autres photomultiplicateurs; elle ne devient meilleure que pour des longueurs d'ondes supérieures à 7000 A.

C/ - DISPOSITIFS D'EXCITATION ET D'OBSERVATION DE LA LUMINESCENCE

1° - A la température ordinaire

a) Fluorescence dans le visible :

Le schéma du montage est représenté sur la figure 8. L'image d'une lampe à vapeur de mercure à haute pression ("Lampe spectrale" Osram) est formée sur l'échantillon par un miroir parabolique percé d'une ouverture en son centre. Une lentille achromatique projette une image de cet échantillon sur la fente d'entrée du monochromateur à prismes de verre. Un ou plusieurs filtres de Wood de 2 mm d'épaisseur sont interposés entre la lampe et le miroir. De cette façon, on excite et on observe la fluorescence des échantillons par la même face de l'échantillon, ce qui réduit la réabsorption du rayonnement de fluorescence par l'échantillon lui-même.

Si on utilise une lampe "MA 125 Mazda" au lieu de la lampe "Osram", la stabilité est beaucoup moins bonne.

Lorsque la région rouge ou infrarouge de la fluorescence est analysée, on absorbe le flux émis par la lampe dans cette région spectrale par une solution ammoniacale de sulfate de cuivre.

b) Fluorescence dans l'ultraviolet

Ici, pour éliminer le groupe de raies à 3650 A, émis par les lampes à vapeur de mercure, on doit filtrer leur rayonnement par une grande épaisseur d'une solution saturée de sulfate de nickel. Ceci empêche d'adopter une disposition analogue à celle utilisée dans le visible. Notre montage est inspiré de celui décrit par SCHOENTHAL et SCOTT (23). Les

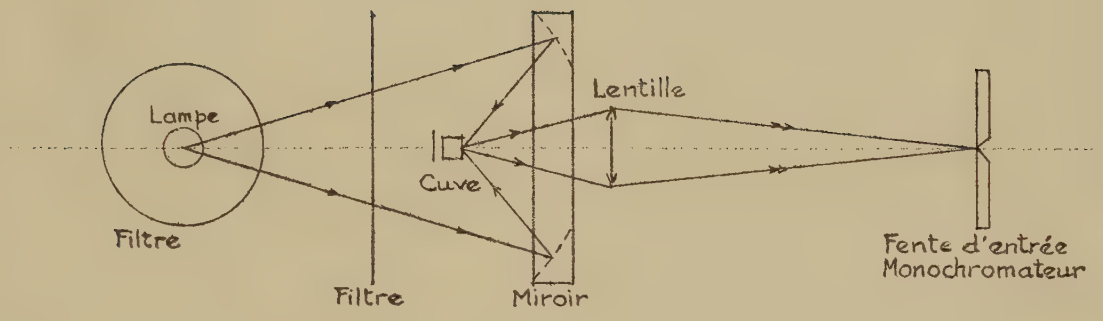


Figure 8 - Dispositif d'excitation et d'observation de la fluorescence visible, à la température ordinaire.

faisceaux excitateurs et d'observation font ici un angle de 90°.

Un ballon de 1 litre en silice fondue rempli d'une solution saturée de sulfate de nickel forme, sur l'échantillon, l'image d'une lampe "Philips SP 500" à vapeur de mercure à haute pression. Une lentille de quartz projette une image de cet échantillon sur la fente d'entrée du monochromateur à prismes de quartz. Pour éliminer le rayonnement émis par la lampe dans le visible, deux filtres "Corning 9863" de 2 mm d'épaisseur sont interposés entre le ballon et l'échantillon. Lorsqu'on veut éliminer l'ultraviolet de courtes longueurs d'ondes, pour éviter une trop grande photolyse des échantillons, on ajoute un filtre "Renovic" de "Sovirel". On obtient alors une excitation presque monochromatique vers 3100 A et la région de l'ultraviolet dans laquelle on peut observer la fluorescence se situe entre 3400 et 4000 A.

Pour observer la fluorescence à des longueurs d'ondes inférieures à 3400 A, on peut remplacer le filtre "Renovic" par 2 cm d'une solution de paranitrophénol 0,3 millimolaire. Ce filtre laisse passer environ 40% du rayonnement excitateur vers 2500 A et un flux lumineux gênant depuis cette longueur d'onde jusqu'à 2900 A. A des longueurs d'ondes plus grandes, il absorbe suffisamment le rayonnement excitateur pour ne pas gêner l'observation de la fluorescence. Avec ce système de filtres, on obtient d'ailleurs des réponses assez faibles avec la plupart des substances luminescentes en raison de la faiblesse de la brillance des lampes dans la région 2500 A. Pour observer la luminescence à des longueurs d'ondes inférieures à 2900 A, nous n'avons pas trouvé de système de filtres convenable.

Les cuves doivent être en silice fondue de qualité "Suprasil", sinon leur fluorescence propre, excitée par des longueurs d'ondes inférieures à 3500 A, est très forte.

2° - <u>A basse température</u>

a) Fluorescence et phosphorescence dans le visible et dans le proche infrarouge :

Un phosphoroscope mécanique avec cryostat à azote liquide a été construit à l'atelier de notre Institut (figure 9).

Un schéma de cet appareil est donné sur la figure 10.

Deux disques percés d'ouvertures de dimensions réglables, tournant autour d'axes horizontaux, perpendiculaires entre eux, assurent l'interruption périodique du flux excitateur, en synchronisme avec l'admission du flux de phosphorescence dans le monochromateur, à une cadence de 25 par seconde.

Le rayonnement excitateur, issu d'un arc à vapeur de mercure (Philips, S.P. 500), est concentré sur l'échantillon par une lentille de quartz. Une lentille de verre forme une image de l'échantillon, sur la fente

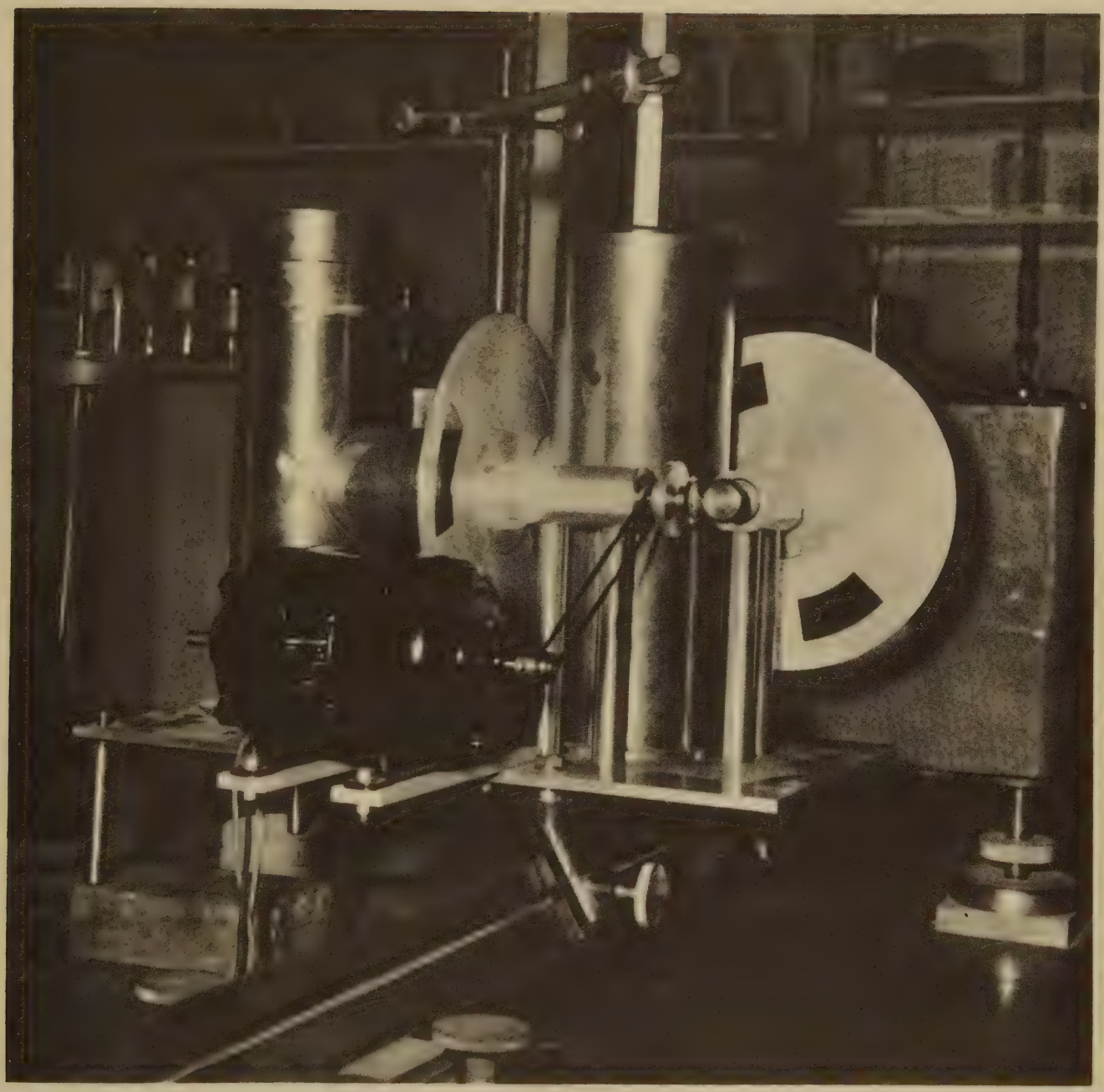


Figure 9 : Phosphoroscope avec cryostat.

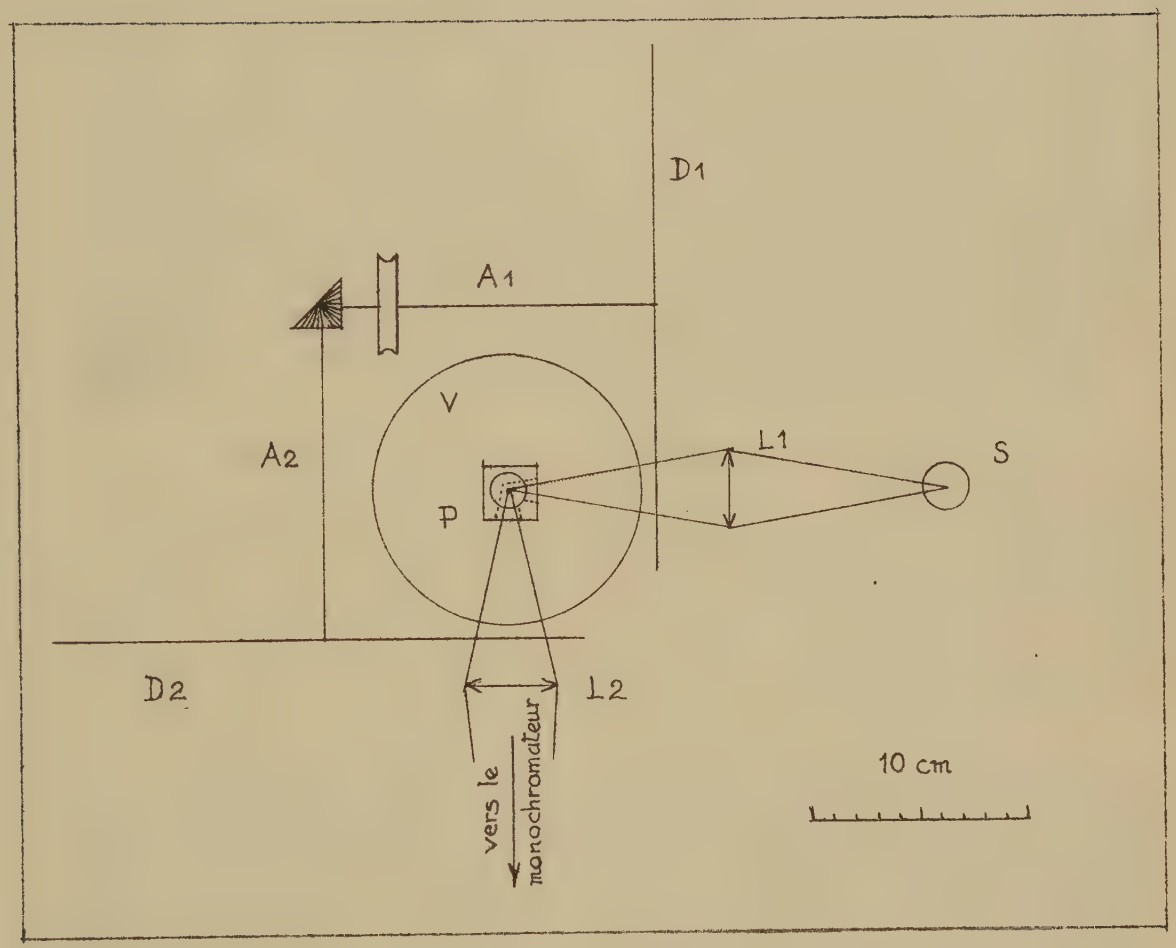


Figure 10

Schéma du phosphoroscope

d'entrée du monochromateur à prismes de verre. Le faisceau excitateur et le faisceau issu de l'échantillon, en direction du monochromateur, sont horizontaux et forment entre eux un angle de 90°. Ces faisceaux traversent les deux doubles fenêtres planes, en silice fondue, d'un vase Dewar non argenté, sans pénétrer dans l'azote liquide qu'il contient.

Les lampes "SP 500" utilisées ont une brillance fortement modulée par les alternances de la tension du secteur et elles s'éteignent presque complètement, 100 fois par seconde. D'autre part, comme le moteur d'entraînement des disques du phosphoroscope est asynchrone, la phase des interruptions varie continuellement par rapport à la phase de la tension du secteur. Donc, on pouvait craindre, pour les luminescences assez rapides, un effet de stroboscopie amenant des instabilités du courant mesuré au galvanomètre. Mais, comme la période du phosphoroscope est de 1/25 de seconde, l'irradiation excitatrice dure environ 1/50 de seconde, c'est-à-dire, à peu près, deux alternances de la tension du secteur. Donc, l'énergie totale délivrée à l'échantillon à chaque ouverture de la fenêtre, livrant le passage au faisceau excitateur, varie peu d'une ouverture à l'autre. Les variations sont encore atténuées, du fait que la période du galvanomètre est de l'ordre de 0,5 seconde et donc que la déviation, à chaque instant, est proportionnelle au total de l'énergie de luminescence atteignant le photomultiplicateur pendant environ 12 admissions successives du faisceau de luminescence.

Le refroidissement de l'échantillon est assuré par contact de la cuve avec une pièce de cuivre (figure 11), dont la partie inférieure trempe dans l'azote liquide. L'échantillon est contenu, soit dans un tube à essai en silice fondue, soit dans une cuve en cuivre dont le dessin est représenté sur la figure 11.

Dans ce dernier cas, l'échantillon est précongelé, la cuve étant placée horizontalement et trempant à moitié dans l'azote liquide. La cuve est ensuite transportée rapidement à son emplacement, dans le cryostat. L'avantage de la cuve de cuivre est d'assurer un bon refroidissement de l'échantillon, d'éviter une double traversée d'une paroi de silice fondue, qui occasionne des pertes de lumière et, enfin, de fournir une surface à peu près plane de l'échantillon. Ce dernier avantage permet, en plaçant cette surface à 45° des faisceaux d'excitation et d'observation, d'éviter une réabsorption trop grande du rayonnement de luminescence par l'échantillon.

On peut craindre un léger givrage de l'échantillon, soit au cours du transport, soit dans le cryostat lui-même. Dans le cryostat le givrage est très faible car un continuel courant d'azote sec s'élève de la surface de l'azote liquide, chassant l'air humide du laboratoire. D'autre part, le support de cuve protège l'échantillon en piégeant l'humidité avant qu'elle n'atteigne celui-ci. Le givrage au cours du transport de la cuve est très réduit si l'on opère rapidement et en plaçant la cuve dans un petit vase Dewar intermédiaire rempli au quart d'azote liquide. De toute façon, la luminescence du givre résiduel est très faible puisque la luminescence à basse température d'une pièce de cuivre semblable à la cuve mais dans laquelle l'emplacement

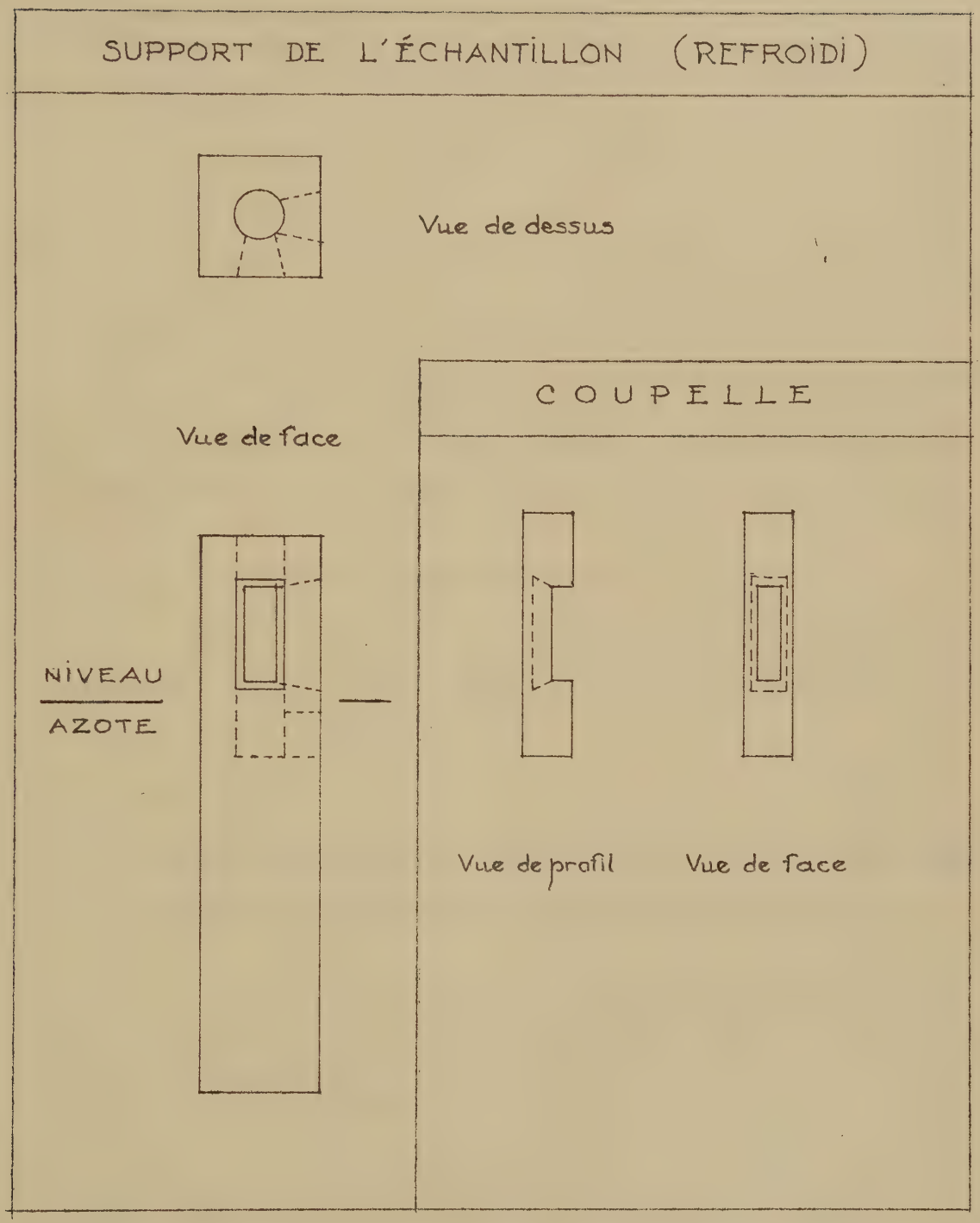


Figure 11 - Coupelle de cuivre et support pour l'étude de la luminescence des solutions congelées à basse température.

réservé habituellement à l'échantillon n'a pas été creusé, est plus faible que la luminescence donnée par les échantillons de solvants purifiés. D'autre part, la présence de traces de givre en contact avec l'échantillon ne semble pas avoir d'influence marquante sur les luminescences que nous avons étudiées. En effet, nous avons vérifié pour quelques exemples que les spectres obtenus dans la cuve de cuivre étaient les mêmes que ceux obtenus dans la cuve de silice fondue.

Le givrage des fenêtres du vase Dewar du cryostat est évité par un jet d'air comprimé.

Pour la fluorescence à basse température, on utilise le même appareil dont on décale les disques de façon à obtenir à la fois le passage du faisceau excitateur et du faisceau de luminescence en direction du monochromateur. Les disques sont alors maintenus immobiles. On intercale des filtres convenables entre la lampe et la lentille de quartz.

b) Fluorescence dans l'ultraviolet :

Le même dispositif qu'à la température ordinaire est utilisé, on y ajoute un vase Dewar en quartz et un support d'échantillon identique à celui décrit précédemment.

D/ - FACTEURS DE CORRECTION PERMETTANT D'OBTENIR LES COURBES SPECTRALES D'ENERGIES A PARTIR DES COURBES SPECTRALES DE REPONSES

On enregistre dans le visible le spectre d'une lampe à ruban ou à filament de tungstène de température de couleur connue Tc. La courbe spectrale d'énergie du rayonnement est très proche de celle du corps noir à la température Tc, et peut donc être calculée. On en déduit immédiatement à un facteur constant près, les coefficients de correspondance pour un spectre continu, à chaque longueur d'onde, entre la réponse donnée par le photomultiplicateur et le flux d'énergie rayonné par la source par unité de longueur d'onde.

Lorsqu'une lampe à filament de tungstène est utilisée il ne faut tenir compte que du rayonnement moyen émis par la lampe, puisque chaque spire peut être à une température différente, et que l'intérieur des spires est plus chaud que l'extérieur. Pour cela, on mesure la température de couleur ainsi que la courbe de réponse, après réflexion diffuse du rayonnement sur un bloc de carbonate de magnésium enfumé de magnésie, réflecteur non sélectif dans le visible (31).

Pour les autres régions spectrales où l'émission du tungstène ne suit plus la loi du corps noir à sa température de couleur, on est obligé de calculer les coefficients de correction $\Sigma\lambda$ à partir des courbes spectrales de transmission $T\lambda$, de dispersion $(dl/d\lambda)_\lambda$ du monochromateur et de sensibilité à énergies égales $\sigma\lambda$ du récepteur. On a, pour un spectre continu, la relation suivante :

$$\Sigma_\lambda = R\lambda / e\lambda = K. \quad T\lambda \cdot \sigma\lambda \cdot (d\lambda/dl)_\lambda$$

$R\lambda$ étant les réponses du détecteur pour un enregistrement à fentes constantes.

$e\lambda$ étant les radiances énergétiques émises par l'échantillon

K étant un facteur indépendant de la longueur d'onde.

Les coefficients $\Sigma\lambda$ sont ici connus avec beaucoup moins de précision, puisque leur détermination dépend de trois facteurs chacun connu avec une imprécision assez grande (de l'ordre de $\pm$ 5%).

Nous avons reproduit sur la figure 12 les courbes spectrales de variation du coefficient $\Sigma\lambda$, pour les différents appareils. On peut voir que la déformation apportée par les appareils aux courbes d'énergies peut être considérable dans certaines régions. On constate en effet que des bandes très petites ou ne se manifestant que par des épaulements dans un enregistrement peuvent correspondre à des bandes très intenses dans le spectre corrigé.

Les coeffcients $\Sigma\lambda$ ne sont valables que pour un spectre con-

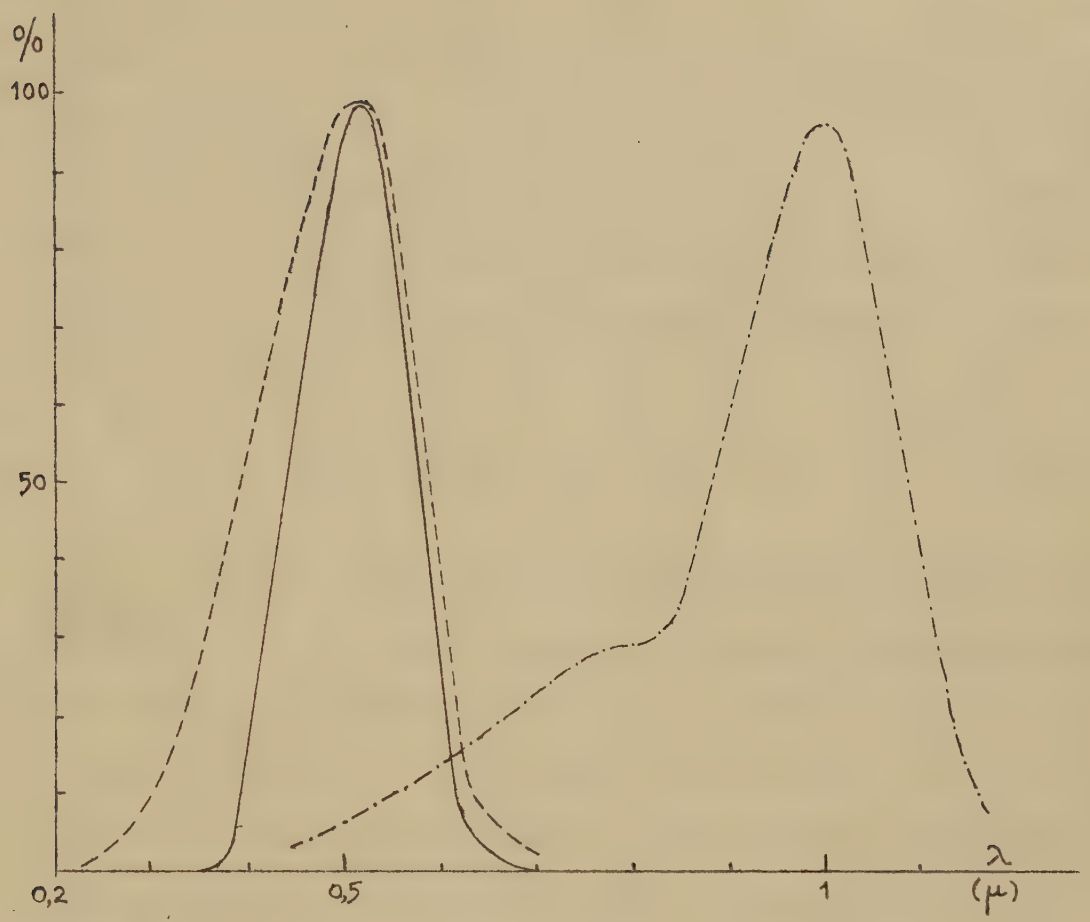


Figure 12 : Courbes spectrales de variation des coefficients $\Sigma\lambda$ par lesquels on doit diviser les ordonnées des courbes spectrales des déviations pour obtenir les ordonnées des courbes spectrales d'énergie.

– – – – – – – Monochromateur à prismes de quartz utilisé avec le photomultiplicateur Lallemand, sensible à l'ultraviolet.

———— Monochromateur à prismes de verre utilisé avec le photomultiplicateur EMI

– · – · – · – Monochromateur à prismes de verre utilisé avec le photomultiplicateur Lallemand, sensible à l'infrarouge.

(On a arbitrairement attribué la valeur 100 à l'ordonnée du maximum de chaque courbe).

tinu. Pour un spectre de raies (c'est-à-dire quand toutes les bandes du spectre ont une largeur moindre que la largeur des bandes isolées par le monochromateur), la dispersion n'intervient plus pour le calcul des coefficients de correction. Les coefficients Σ'_λ donnant, à un facteur K' constant près, les rapports entre les réponses de l'appareil au maximum des différents pics et les radiances énergétiques monochromatiques correspondantes de la source donnés par :

$$\Sigma'_\lambda = K' . T\lambda . \sigma\lambda$$

Lorsque certaines bandes du spectre ont une largeur du même ordre de grandeur que la largeur des bandes isolées par le monochromateur, il n'y a pas de moyen, semble-t-il, de représenter les spectres avec une grandeur qui ne dépende pas de l'appareil. Il faut, dans ce cas, pour rendre comparables les résultats obtenus avec deux appareils différents, connaître la largeur des bandes isolées par les monochromateurs. On peut ainsi se rendre compte dans quelle mesure les grandeurs énergétiques calculées sont perturbées.

Lorsqu'un spectre comporte des raies et un fond continu, on doit donner, à la fois, la courbe spectrale d'énergie pour les régions continues et les rapports des radiances énergétiques pour les différentes raies. L'importance des raies par rapport au fond continu peut d'ailleurs être évaluée en tenant compte de la largeur des bandes isolées par le monochromateur.

E/ - ENREGISTREMENT DES COURBES DE DECROISSANCE DES LUMINESCENCES LENTES

1° - Durées de vies de l'ordre de 2 secondes et plus.

Lorsque la décroissance est assez lente, on peut enregistrer

directement la courbe de décroissance au galvanomètre. dont la période est de l'ordre de la seconde. La courbe de décroissance est enregistrée automatiquement avec un suiveur de spot, après un éclairement qui dure quelques secondes et que l'on interrompt brusquement.

2° - Durées de vie inférieures à 2 secondes

Dans ce cas on procède comme suit :

On obture l'une des deux ouvertures du disque du phosphoroscope, servant à interrompre le faisceau d'excitation. On procède de même pour le disque servant à interrompre le faisceau de luminescence. On règle la largeur des ouvertures, à environ 1/8 du périmètre des disques. Puis on règle le décalage des disques l'un par rapport à l'autre, de façon à ce que l'observation soit faite à des instants correspondants à 1,5/8 - 2,5/8 - 3,5/8 - 4,5/8 - 5,5/8-6,5/8 de tours après l'instant auquel l'excitation est produite.

Si la vitesse de rotation des disques est réglée de façon à ce que, lorsque la mesure est effectuée avec un décalage de 6,5/8 de tours, la réponse du récepteur soit petite par rapport à celle donnée avec un décalage de 1,5/8 de tours, on peut admettre que l'excitation qui a été faite durant l'une des révolutions ne contribue que très peu à l'émission de l'échantillon durant les révolutions ultérieures. La courbe représentative de la variation de la réponse du récepteur en fonction du décalage des deux disques l'un par rapport à l'autre, est donc assez proche de la courbe de décroissance de la luminescence en fonction du temps qui s'est écoulé entre la fin de l'excitation et la fin de l'observation. Mais la coïncidence n'est qu'approchée, du fait que le passage du faisceau d'observation est livré pendant une fraction assez importante de l'intervalle de temps total pendant lequel

l'observation de la décroissance est faite.

Cependant, si la décroissance est exponentielle et ne dépend que du nombre de molécules excitées à un instant donné qui suit l'interruption de l'excitation, ce qui est le cas le plus général, les inconvénients précédents n'ont aucune influence sur la forme de la courbe et sur la mesure de la constante de temps τ .

En effet :

Soit No la concentration des molécules excitées à l'instant $t = 0$, qui se situe immédiatement après l'interruption du faisceau excitateur et avant le début du passage du faisceau de luminescence.

La concentration des molécules excitées à l'instant t est

$$N = No \; e^{\frac{-t}{\tau}}$$

La brillance de l'échantillon est proportionnelle à N.

Soit $f(\Delta t)$ la proportion du flux qui est admis vers le monochromateur, à l'instant $t = t1 + \Delta t$, par rapport au flux admis à l'instant t1 (t1 étant l'instant où le centre de l'ouverture du disque est sur l'axe de la lentille qui projette l'image de l'échantillon sur la fente d'entrée du monochromateur). L'énergie E recueillie à la fente d'entrée du monochromateur pendant une impulsion correspondant à un passage de l'ouverture devant la lentille sera :

$$E = K\,N\bullet \int_{t1-a}^{t1+a} f(t-t1)\, e^{\frac{-t}{\tau}}\, dt$$

$t1 - a$ étant l'instant auquel l'observation commence
$t1 + a$ étant l'instant auquel l'observation se termine
avec la variable $\Delta t = t - t1$
E devient, puisque $d(\Delta t) = dt$:

$$E = K\,No \int_{-a}^{+a} f(\Delta t)\, e^{-\frac{t1+\Delta t}{\tau}}\, d(\Delta t)$$

$$= K\,No \left[\int_{-a}^{+a} f(\Delta t)\, e^{\frac{-\Delta t}{\tau}}\, d(\Delta t) \right] e^{\frac{-t1}{\tau}}$$

Donc, en fonction de t1, l'énergie E de chaque impulsion, sera une exponentielle avec une constante de temps τ puisque la dernière intégrale ne dépend que de a, de τ et de la forme de la fonction f qui est la même quelque soit le décalage, puisque c'est toujours la même ouverture du disque qui laisse passer le faisceau d'observation.

F/ - CELLULE A TEMPERATURE VARIABLE

Pour l'étude des influences des changements de température sur la luminescence, nous avons réalisé un dispositif permettant de porter l'échantillon à une température quelconque entre + 100°C et - 190°C. Il n'a été employé ici que pour le domaine de température -100° C à -190°C, en utilisant, l'azote liquide comme substance réfrigérante.

L'élément principal est un support analogue à celui représenté sur la figure 11, mais dont la partie trempant dans l'azote liquide a une forme conique (figure 13). Lorsque la longueur dont la pointe trempe dans l'azote diminue, la température moyenne de la pièce au niveau où un logement a été aménagé pour recevoir les cuves, augmente.

Pour stabiliser la température à une valeur donnée, on entretient constante la hauteur du niveau d'azote dans le vase Dewar avec un dispositif analogue à celui inventé par M. TERMINASSIAN et M. MIGIRDICYAN (brevet C.N.R.S.).

Quelques modifications ont été apportées à ce dispositif pour l'adapter à notre problème particulier (figure 10). La cellule dont le contact dans l'azote liquide provoque une condensation d'air et donc une aspiration de mercure, est en métal, ainsi que la tuyauterie, de façon à assurer une plus grande résistance mécanique. Le tuyau conduisant l'azote de la réserve au vase d'expérience est très court (20 cm à l'air du laboratoire) et de petit diamètre (d'intérieur = 3 mm) et est calorifugé avec de la mousse plastique adhésive pour éviter une trop grande perte d'azote. Comme nous avons remarqué que la pastille en verre fritté permettant la décompression du vase contenant la réserve d'azote était colmatée, à la longue, par des gouttelettes de mercure, nous avons adopté le système d'échappement plus simple représenté sur la figure 13. Ce système fonctionne bien dans notre montage où la différence entre le niveau de l'azote liquide du vase d'expérience et celui de la réserve, est faible (plus petite que 30 cm).

Avec une réserve d'azote de l'ordre de 1 litre, le niveau est maintenu dans le vase d'expérience pendant 2 heures.

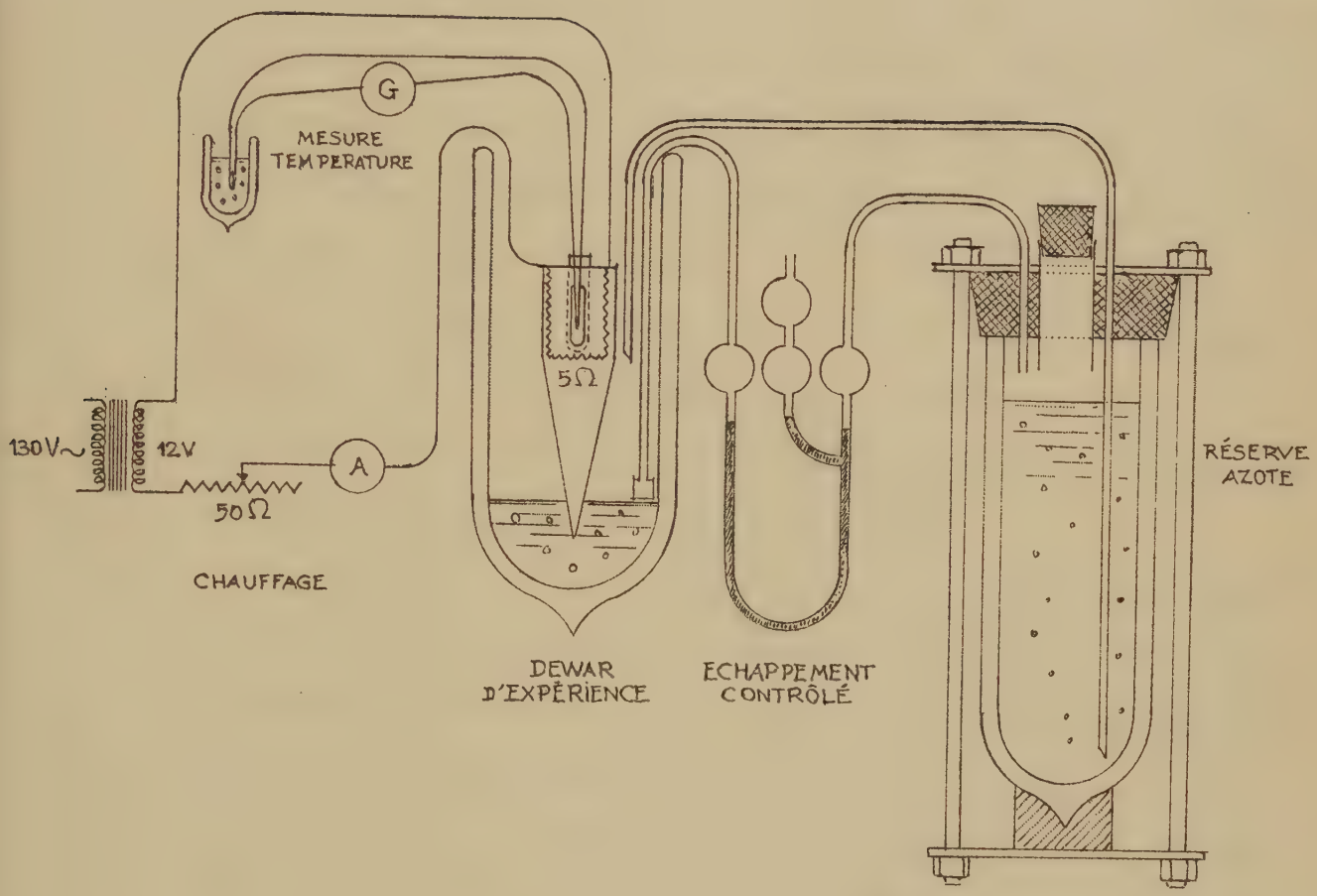


Figure 13 - Dispositif pour l'étude de l'influence de la température sur la luminescence.

Pour rendre plus aisé et plus précis le réglage de la température ainsi que pour élargir le domaine de température accessible, une résistance chauffante de 5 ohm, sous gaine souple incombustible, traverse 4 canaux de 2 mm de diamètre, creusés dans le support de cuve. Cette résistance est alimentée par une tension continûment réglable de 0 à 12 V.

Pour obtenir la température voulue, on règle d'abord le niveau d'azote liquide, puis on ajuste la température en agissant sur la tension appliquée aux bornes de la résistance.

La mesure de la température est faite avec un thermocouple en cuivre et plomb soudés à l'étain : une des soudures est placée dans la cuve même (cuve en silice) et emprisonnée dans l'échantillon congelé; l'autre soudure trempe dans de l'azote liquide.

On peut avec ce dispositif stabiliser la température donnée par le thermocouple à mieux que $\pm$ 2 degrés près. Le passage d'une température constante à une autre en différant de 10 degrés demande environ 15 minutes. Lors de l'irradiation, on observe une augmentation de la température, pouvant atteindre 5° probablement dans le cas où la soudure du couple se trouve dans la région de la cuve où le rayonnement excitateur est absorbé.

G/ - STABILISATION ET ENREGISTREMENT

1° - Stabilisateurs

a) La tension délivrée par toutes les prises du laboratoire est stabilisée à 0,25% près avec une vitesse de correction de 10 volts par seconde par un stabilisateur automatique électromécanique 15 70 AL Q6 de "Général Radio".

b) Les tensions appliquées aux photomultiplicateurs sont stabilisées électroniquement au 1/10.000° près.

2° - Enregistrement automatique

Les pièces optiques mobiles du monochromateur pour le visible sont entraînées par moteur synchrone. On peut obtenir plusieurs vitesses de déroulement et la marche arrière par l'utilisation de deux moteurs de vitesses de rotation différentes et d'un système d'engrenages.

Un suiveur de spot enregistre les déviations du galvanomètre. On obtient ainsi un enregistrement automatique des spectres, avec une gamme étendue de vitesses de déroulement et d'étalement des spectres.

II - TECHNIQUES DE PURIFICATIONS

A/ - CHROMATOGRAPHIES DES HYDROCARBURES AROMATIQUES

Les échantillons d'hydrocarbures aromatiques contiennent le plus souvent des traces d'impuretés dont la luminescence s'ajoute à celle du constituant principal. Si le composé étudié a un rendement de luminescence faible par rapport à celui des impuretés, sa luminescence peut être complètement masquée par celle des impuretés. Dans ce cas, la purification des substances est indispensable. Lorsque certains arguments ont permis d'attribuer au principal constituant le spectre enregistré, la purification permet d'apporter une confirmation à cette conclusion.

La seule technique susceptible d'éliminer une petite proportion d'impureté contaminant un hydrocarbure, et de fournir les quantités qui nous étaient nécessaires de ce dernier, est, semble-t-il, la chromatographie sur colonne d'alumine ou de silice.

Or, on a constaté que si cette technique permet effectivement, dans la plupart des cas, une séparation des constituants du mélange,

elle apporte en même temps de nouvelles impuretés, si bien que, souvent, on enregistre pour l'hydrocarbure chromatographié une luminescence supérieure, dans certaines régions spectrales, à celle de l'échantillon non chromatographié. Si, dans ces régions spectrales, on avait enregistré un spectre, avant chromatographie, qu'on hésitait à attribuer au constituant principal, on ne pouvait conclure après chromatographie, puisque sa persistance, éventuelle aurait été masquée par la luminescence des impuretés apportées par cette chromatographie. L'origine de ces impuretés additionnelles n'a pu être déterminée avec certitude, mais il semble résulter de nos expériences qu'elles proviennent principalement d'une destruction partielle de l'hydrocarbure pendant qu'il est adsorbé sur l'alumine ou sur la silice. La lumière ambiante semble intervenir pour accélérer cette destruction, mais les chromatographies effectuées à l'abri de la lumière donnent encore ce phénomène, bien que d'une façon moins marquée.

Nous décrirons les techniques utilisées qui varient suivant la quantité d'hydrocarbure pur demandée et suivant les précautions prises pour essayer de réduire la destruction des hydrocarbures au cours des chromatographies.

Technique n° 1

Quantité d'hydrocarbure mis à chromatographier inférieur à 10 mg.

Colonne de diamètre inférieur ou égal à 6 cm. Hauteur d'alumine de 30 cm environ.

L'alumine des Etablissements Prolabo "Afnor 19-24," est chauffée 10h. à 180°C immédiatement avant l'emploi. Elle est introduite dans la colonne par fractions correspondant à 1 cm de hauteur, en opérant un tassage avec un bouchon de liège à chaque addition. On imbibe ensuite l'alumine avec du cyclohexane. On fixe le produit, en solution dans du cyclohexane, et on développe en augmentant progressivement la proportion de benzène, pour finalement procéder à l'élution avec un mélange à 50% de benzène et 50% de cyclohexane environ.

Pour accélérer la vitesse d'écoulement, on établit une dépression sous la colonne par aspiration avec une trompe à eau.

Les éluats sont récupérés dans de gros tubes placés dans la fiole à vide où est branchée la trompe à eau.

Pour éviter la photolyse des substances adsorbées sur alumine, on opère dans une pièce peu éclairée, et la colonne est entourée d'une feuille de papier noir dans laquelle a été découpée une étroite fente verticale pour l'observation en lumière ultraviolette.

Les éluats contenant le constituant principal sont évaporés sous le vide de la trompe à eau, au bain-marie vers 60°C. Le résidu est repris par du cyclohexane et, soit soumis à une autre chromatographie, soit recristallisé en évaporant au bain-marie bouillant le cyclohexane à un très petit volume.

Après une chromatographie et une recristallisation, le rendement est inférieur en général à 30%.

Le benzène utilisé est préalablement soigneusement distillé sur une colonne de 2 m. de haut, et le cyclohexane purifié par passage sur une colonne d'alumine.

Technique n° 2 -

La technique est modifiée de la façon suivante par rapport à la technique n° 1; elle n'a été utilisée que pour le 3-4 benzopyrène:

Quantité d'hydrocarbure mise à chromatographier : 50 mg.
Colonne de 10 cm de diamètre et de 40 cm de haut.

Pour essayer d'éviter l'oxydation par l'oxygène de l'air, on fait passer de l'azote gazeux à travers la colonne d'alumine encore sèche, et on chasse l'oxygène des solvants en y faisant barbotter de l'azote. Cette précaution s'est révélée d'une certaine efficacité pour diminuer l'apparition d'impuretés dans le produit chromatographié.

Comme nous avions remarqué qu'avec un diamètre de colonne aussi gros, les déformations du front de progression des substances étaient très importantes et que par exemple les produits situés au centre de la colonne progressaient beaucoup moins vite que ceux situés à la périphérie, nous avons récupéré le produit de la façon suivante :

Nous arrêtons le développement juste avant l'élution, puis nous sortons la masse d'alumine encore humide de la colonne et nous séparons avec une spatule les parties de la colonne les plus fluorescentes que l'on élue ensuite avec du benzène pur. Ce moyen de récupération semble bien meilleur que l'autre puisque nous réussissons à séparer les impuretés du 3-4 benzopyrène, phosphorescentes dans le visible, par une seule chromatographie au lieu des deux ou trois qui sont nécessaires autrement.

On élimine les solvants par sublimation de la solution congelée, sous le vide d'une pompe à palette. On évite ainsi toute destruction de la substance au cours de l'évaporation, cependant on constate un entraînement assez important de la substance en solution vers le piège (perte de 20%). On reprend le résidu sec par l'éther. On évapore à 40°C à un petit volume. On laisse cristallier à -70°C puis on centrifuge pour récupérer les cristaux.

B/ - SOLVANTS

1° - D'une façon générale, les solvants commerciaux contiennent des impuretés luminescentes, gênantes dans la plupart des expériences. Ces solvants doivent donc être purifiés.

Une ou deux distillations lentes sur une colonne de 2 mètres de haut fournit en général un solvant contenant très peu d'impuretés luminescentes. Mais certains solvants peuvent être purifiés d'une façon plus poussée par passage sur une colonne d'alumine préalablement chauffée 2 heures à 180° C. Ce sont les hydrocarbures saturés, de faible pouvoir éluant pour les substances luminescentes telles que les hydrocarbures et les hétérocycles. Cette dernière technique a été utilisée pour le cyclohexane, l'éther de pétrole, le pentane et l'octane.

2° - Pour tous les solvants purifiés contenant des liaisons C-H on voit par excitation à 3650 A, une raie Raman vers 4080 A qui correspond à la vibration 3000 cm^{-1} du C-H. Lorsque cette raie interfère avec des bandes de fluorescence de produits dissous à faible concentration, on peut remplacer les solvants habituels par le tétrachlorure de carbone qui ne donne pas de raie Raman intense vers 3000 cm^{-1}.

III - NOMENCLATURE

Comme l'accord n'est pas fait entre les auteurs qui se sont occupés de photoluminescence, sur tous les termes à utiliser pour désigner les différents phénomènes, il convient de définir le sens dans lequel nous emploierons les principaux termes.

A/ - FLUORESCENCE

Nous utiliserons "fluorescence" dans le sens restreint de l'émission de rayonnement par passage de molécules d'un niveau singulet excité à l'état fondamental (en ne considérant que les molécules dont l'état fondamental est un singulet), l'excitation étant préalablement faite par absorption de photons portant ces molécules de l'état fondamental à un état singulet.

Sauf dans le cas de substances telles que l'azulène (33), les photons de fluorescence sont émis par passage du premier singulet à l'état fondamental.

La fluorescence ne persiste, après l'interruption du rayonnement d'excitation, que 10^{-9} à 10^{-5} seconde (34) suivant que la transition de l'état premier singulet à l'état fondamental est plus ou moins interdite par raison de symétrie.

B/ - PHOSPHORESCENCE (ou luminescence lente)

Nous appellerons "phosphorescence" toute photoluminescence que l'on peut détecter avec un phosphoroscope mécanique, c'est-à-dire toute photoluminescence qui persiste plus que 10^{-5} seconde après l'interruption du rayonnement d'excitation.

C/ - PHOSPHORESCENCE (OU LUMINESCENCE) T → S

La phosphorescence T → S est une phosphorescence due au passage de molécules d'un niveau triplet à l'état fondamental. Il est admis, en général, que seul l'état premier triplet donne lieu à la phosphorescence. T → S.

D/ - FLUORESCENCE RETARDEE

Nous appellerons fluorescence retardée toute luminescence lente dont le spectre est le même que celui de la fluorescence.

E/ - PHOSPHORESCENCE α

La phosphorescence α est une fluorescence retardée due au mécanisme suivant :

Une molécule, après excitation dans un état singulet, par le rayonnement excitateur, passe dans son état premier triplet; elle retourne alors dans son état premier singulet, l'énergie nécessaire à cette transition étant empruntée à l'énergie thermique des molécules environnantes; elle émet alors un photon par retour à l'état fondamental, avec un retard égal au temps qu'elle a séjourné dans l'état premier triplet.

Cette nomenclature est celle qui semble être actuellement la plus utilisée, elle est très proche de celle de LEWIS et KASHA (35).

Dans une nomenclature plus ancienne, utilisée par exemple par PRINGSHEIM (36), ce que nous appelons "phosphorescence T S" était appelée "fluorescence lente", et n'était considérées comme phosphorescence que les luminescences lentes du type de la phosphorescence α.

CHAPITRE III

SPECTRES DE PHOSPHORESCENCE T --> S DANS LE ROUGE ET LE PROCHE INFRAROUGE

Si la localisation du niveau premier triplet des hydrocarbures aromatiques à petit nombre de noyaux (4 ou moins) et les spectres de phosphorescence qui correspondent à des transitions de ce niveau à l'état fondamental sont bien connus (35), il n'en est pas ainsi des mêmes caractéristiques relatives aux hydrocarbures plus lourds. Il résulte de notre travail que les spectres de phosphorescence dûs à ces transitions, pour un certain nombre de ces hydrocarbures lourds, se situent entièrement dans l'extrême rouge et le proche infrarouge. Or, cette région spectrale était jusqu'à présent difficilement accessible en luminescence, en raison de la faible sensibilité des récepteurs dans ce domaine. Ce qui explique probablement que ces spectres aient passé inaperçus jusqu'à présent.

La récente mise au point des photomultiplicateurs de haute sensibilité dans l'infrarouge nous a permis d'enregistrer les spectres de phosphorescence dûs à des transitions du premier triplet à l'état fondamental (spectre $T_1 \rightarrow S_0$) des hydrocarbure suivants :

3-4 benzopyrène, 3-4-9-10 dibenzopyrène, 8-méthyl, 3-4-9-10 dibenzopyrène, 5-8 diméthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène, 3-4-8-9 dibenzopyrène, 10 méthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène, 5-10 diméthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène, anthanthrène, 6 méthyl anthanthrène, 6-12 diméthyl anthanthrène (x).

(x) Nous remercions M. N.P.BUU-HOI et Mlle D. LAVIT, qui nous ont aimablement fourni la plupart de ces composés.

La principale difficulté à laquelle se heurtait cette étude était la présence d'impuretés phosphorescentes dans un certain nombre des substances étudiées. L'attribution des spectres enregistrés, ou d'une partie de ceux-ci, au constituant principal nécessitait un travail préalable de purification.

Malgré les inconvénients signalés au chapitre II, nous avons utilisé systématiquement la chromatographie sur colonne.

En effet, dans la région rouge et infrarouge des spectres, la phosphorescence des substances est suffisamment forte par rapport à celle des impuretés apportées par les chromatographies, pour que la persistance des spectres initiaux soit nette. C'est surtout dans le visible où la phosphorescence des échantillons est faible que ces impuretés additionnelles sont gênantes.

Il reste néanmoins que l'attribution de certaines parties des spectres aux transitions $T_1 \longrightarrow S_o$ au constituant principal nécessite des arguments indépendants de ceux apportés par leur persistance après chromatographie, puisqu'on ne sait pas toujours si c'est la seule partie des spectres à subsister après la séparation des impuretés présentes dans les échantillons de départ.

Ces arguments ont été trouvés dans les faits suivants :

a) Ressemblance des spectres des dérivés méthylés avec ceux des hydrocarbures fondamentaux, et déplacements bathochromes des premiers par rapport aux derniers, du même ordre de grandeur que ceux observés en absorption et en fluorescence.

b) Déplacement des spectres $T_1 \longrightarrow S_o$ de l'ordre de 10.000 cm^{-1} vers l'infrarouge par rapport aux spectres de fluorescence.

c) Parfois, structure vibrationnelle du spectre $T_1 \longrightarrow S_o$ analo-

gue à celle du spectre de fluorescence.

d) Analogie de la structure vibrationnelle des spectres enregistrés dans le rouge pour les différents hydrocarbures fondamentaux. Déplacement bathochrome des spectres des hydrocarbures les plus lourds, par rapport à ceux des hydrocarbures comportant un plus petit nombre de cycles benzéniques.

e) Pour certains hydrocarbures, existence d'un spectre d'absorption de très faible coefficient moléculaire, de solutions dans l'iodure d'éthyle (37), ou sous pression d'oxygène, dû à des transitions $So \rightarrow T1$. Ce spectre doit donc être, à peu près, symétrique au spectre de phosphorescence $T1 \rightarrow So$ par rapport à la fréquence de la transition $0 \rightarrow 0$. (Cette dernière fréquence est, en général proche de celle de la bande la plus intense et de plus grande fréquence du spectre de phosphorescence $T \rightarrow S$.)

f) Enfin, l'argument le plus fort pour les hydrocarbures non substitués, la coïncidence approximative de la fréquence de la bande de plus grande fréquence du spectre avec le résultat d'un calcul théorique de la hauteur du niveau 1° triplet.

1 - 3-4 BENZOPYRENE

La phosphorescence du 3-4 benzopyrène a fait l'objet d'une étude de ILINA et CHPOLSKII (38). Ces auteurs ont détecté une faible phosphorescence de solutions concentrées dans l'acide borique, à la température du laboratoire. Le spectre qu'ils enregistrèrent, présentait deux bandes diffuses à 5900 Å et 6300 Å. Mais, en solution dans les solvants habituels (alcool, benzène, etc...) congelés à -190°C, le 3-4 benzopyrène, d'après

ces derniers auteurs, ne serait pas phosphorescent.

Une expérience de CRAIG et ROSS (39) semble montrer que le rayonnement ultraviolet excite efficacement sous la forme du premier triplet, le 3-4 benzopyrène en solution dans un mélange d'éther, d'isopentane et d'éthanol (E.P.A.) En effet, ils ont observé un spectre d'absorption, qui apparaît sous l'action d'un fort éclairement ultraviolet, et qu'ils ont attribué à des transitions de l'état T_1 à l'état T_2. Comme l'état T_1 entraîne généralement une émission de phosphorescence chez d'autres hydrocarbures aromatiques, on pouvait s'attendre à une telle émission par le 3-4 benzopyrène.

D'autre part, l'application de la règle indiquant un déplacement bathochrome d'environ 10.000 cm-1 du spectre $T_1 - S_o$, par rapport au spectre de fluorescence, permettait de localiser "a priori" un spectre de phosphorescence vers des longueurs d'ondes immédiatement supérieures à 6500 A (40). L'emploi de récepteurs insensibles dans cette région spectrale pouvait expliquer qu'il n'ait pas été détecté par ILINA et CHPOLSKII. Cette idée était d'ailleurs confirmée par le résultat du calcul théorique de HALL (41) qui place le premier triplet du 3-4 benzopyrène à 1,68 ev, ce qui correspond à 7374 A.

Nous avons donc repris cette recherche avec notre appareil spécialement conçu pour l'étude de la luminescence dans le rouge et le proche infrarouge. Nous avons pu montrer que le 3-4 benzopyrène en solution dans l'éthanol à 95%, congelé à -190°C, émet une phosphorescence dont le spectre est situé entre 6700 A et 10500 A (figure 14). Ce spectre a pu être attribué sans équivoque à des transitions du premier triplet à l'état fondamental.

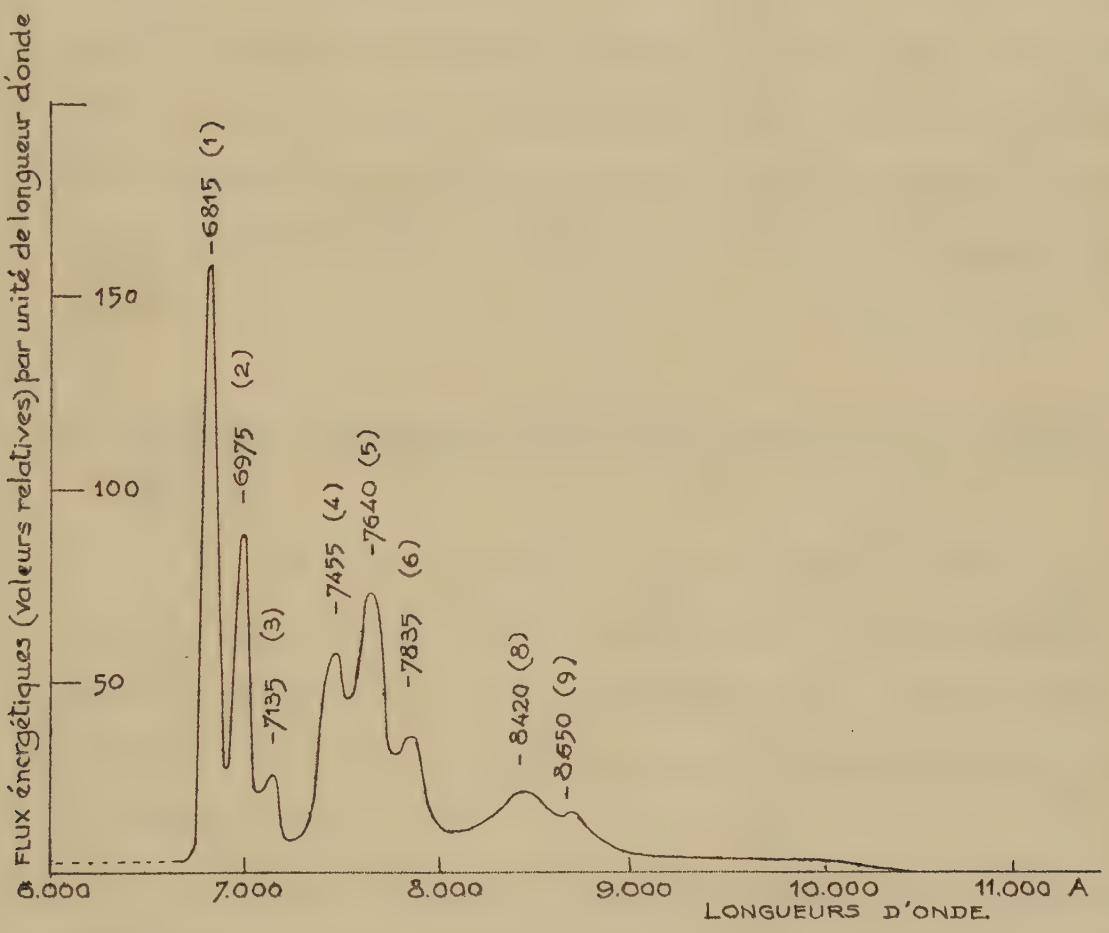


Figure 14 - Spectre de phosphorescence du 3-4 benzo pyrène, à - 190°C, en solution alcoolique à la concentration de 100 γ/cm^3.
"Spectre Rouge"

La concentration des solutions utilisées pour ces expériences est de 100 γ par cm^3. L'excitation est faite par le rayonnement d'une lampe "SP 500", filtré par 3 cm de verre. La majeure partie de l'énergie d'excitation absorbée par le 3-4 benzopyrène, est donc concentrée dans le groupe de raies du mercure situé vers 3650 A.

La largeur de bandes isolées par le monochromateur à 8000 A est de 70 A dans ces expériences.

La partie des spectres située entre 6700 A et 10500 A, enregistrée avec le photomultiplicateur sensible à l'infrarouge, sera appelée "spectre rouge". La partie située entre 5000 A et 6700 A, enregistrée avec le photomultiplicateur EMI, sera appelée "spectre visible". La partie située à des longueurs d'ondes inférieures à 5000 A sera étudiée au chapitre IV.

A/ - SPECTRES DE PHOSPHORESCENCE DONNES PAR DES ECHANTILLONS DE DIVERSES ORIGINES

1° - Le 3-4 benzopyrène de la firme "Eastman Kodak" donne le "spectre rouge" représenté sur la figure 14 et le "spectre visible n° 1" représenté sur la figure 15. L'énergie émise par la solution sous la forme du "spectre visible n° 1" est environ 5% de celle émise sous la forme du "spectre rouge".

2° - Le 3-4 benzopyrène de la firme Fluka donne un "spectre rouge" identique au précédent, mais son "spectre visible" enregistré entre 5000 et 6700 A, est très différent du "spectre visible n° 1"; l'intensité émise est environ 10 fois moins forte, et la plupart des bandes sont à des longueurs d'ondes différentes.

3° - Un échantillon que nous possédions au laboratoire et dont l'origine nous est inconnue, donnait un "spectre rouge" identique aux précédents, et un "spectre visible" présentant les mêmes bandes que le "spectre

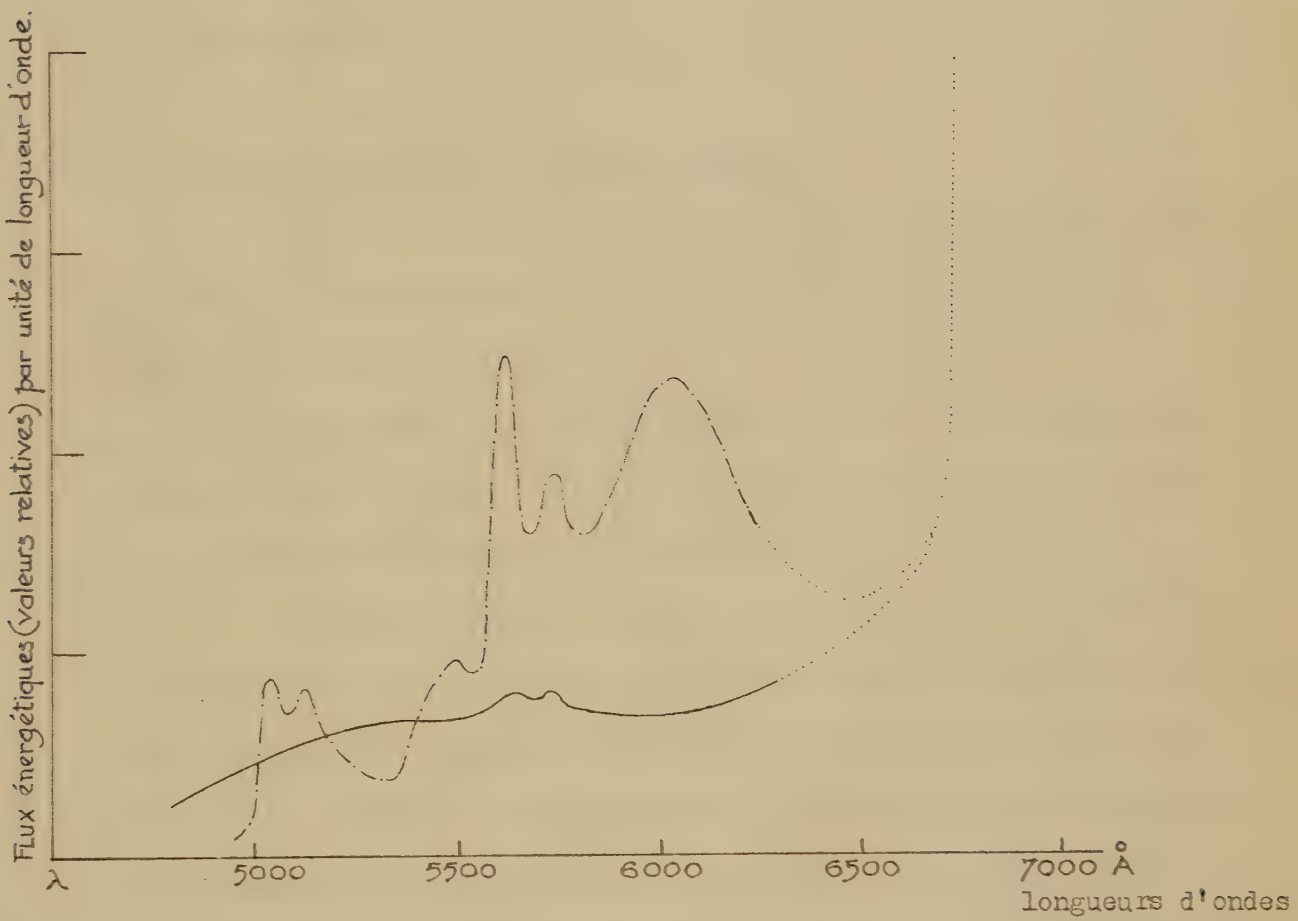


Figure 15 - Spectres de phosphorescence à -190°C de deux Echantillons de 3-4 benzopyrène, en solution alcoolique, à la concentration de 100 γ /cm³.

——·——·—— Echantillon commercial :"Spectre visible n° 1"

———————— Echantillon purifié : "Spectre visible n° 2"

·····Parties des spectres connues avec moins de précision.

visible n° 1" mais avec des intensités relatives très différentes.

Les observations précédentes semblent indiquer que le "spectre rouge" est dû à une émission du 3-4 benzopyrène, mais que les "spectres visibles" sont dus à des impuretés.

Pour le vérifier, il fallait soumettre l'un des échantillons à une purification.

B/ - PURIFICATION JUSQU'A SPECTRE CONSTANT

Nous avons soumis l'échantillon "Eastman Kodak" à une purification par chromatographies sur alumine et sur silice, suivant la technique n° 1 décrite au chapitre II.

Ces purifications ne produisirent aucun changement dans le "spectre rouge" (figure 14), ce qui confirme que ce spectre est dû à une émission du 3-4 benzopyrène lui-même.

Les bandes présentes dans le "spectre visible n° 1" (figure 15) diminuèrent d'intensité, après chaque chromatographie. Après la troisième chromatographie, le spectre obtenu ("spectre visible n° 2" fig. 15) était dans l'ensemble moins intense que celui du produit commercial et était constitué par un fond continu dans lequel les bandes présentes dans le "spectre visible n° 1" ne se manifestaient que par des irrégularités à peine décelables. Les bandes du "spectre visible n° 1" paraissent donc bien dues à une émission d'une ou plusieurs impuretés qui s'éliminent au cours des chromatographies.

On peut remarquer qu'à certaines longueurs d'ondes, les ordonnées du "spectre visible n° 2" sont plus hautes que celles du "spectre visible n° 1". Il s'agit ici du phénomène qui a été signalé dans le chapitre II, concernant l'apport, par les chromatographies, d'impuretés supplémentaires. On peut constater que ces impuretés ne sont pas apportées par les solvants utilisés pour les chromatographies, car ces derniers avaient été purifiés jusqu'à ce que leur phosphorescence dans le visible fut inférieure à celle des éluats contenant le 3-4 benzopyrène.

C/ - ANALYSE DU SPECTRE "ROUGE"

Le spectre de la figure 14 se compose de trois systèmes de bandes :

1	6815 A	14670 cm^{-1}
2	6975 -	14340 -
3	7135 -	14020 -
4	7455 -	13410 -
5	7640 -	13090 -
6	7835 -	12760 -
8	8420 -	11880 -
9	8650 -	11560 -

On relève les intervalles suivants entre les bandes :

1 - 4	1260 cm^{-1}	1 - 2	330 cm^{-1}
2 - 5	1250 -	2 - 3	320 -
3 - 6	1260 -	4 - 5	320 -
5 - 8	1220 -	5 - 6	330 -
6 - 9	1200 -	8 - 9	320 -

La limite supérieure des erreurs commises sur les pointés des maxima varie de $\pm$ 10 A à $\pm$ 30 A (de $\pm$ 20 cm^{-1} à $\pm$ 40 cm^{-1}) suivant la région spectrale considérée.

Ceci montre que les différences entre les fréquences d'une même colonne ne sont probablement pas significatives. On peut donc admettre que les fréquences de toutes les bandes du spectre se déduisent de la fréquence de la bande n° 1 par combinaisons additives avec les fréquences 1250 cm^{-1} et 325 cm^{-1}, ou leurs multiples entiers.

Des intervalles identiques se retrouvent dans le spectre de phosphorescence du 3-4 benzopyrène en solution dans l'hexane normal. Ces fréquences seraient donc des fréquences de vibration de la molécule du 3-4 benzopyrène et non des fréquences dues à une interaction avec le solvant.

Nous avons enregistré le spectre de fluorescence du 3-4 benzopyrène en solution hexanique à la température du laboratoire. En échelle de fréquen-

ces, ce spectre révèle les analogies suivantes avec le spectre de phosphorescence (figure 16):

1) La présence de trois groupes de bandes, séparés par les mêmes intervalles de fréquence et d'intensités relatives comparables.

2) La même succession des trois premières bandes séparées par les mêmes intervalles de fréquence, aux erreurs expérimentales près.

D'importantes différences apparaissent cependant dans le deuxième groupe de bandes; d'autre part, à la bande de fluorescence de plus grande fréquence, ne correspond pas de bande de phosphorescence.

Or, CHPOLSKII et ILINA (42) ont enregistré le spectre de fluorescence du 3-4 benzopyrène à -190°C en solution dans l'huile de paraffine. A cette température, la bande de plus grande fréquence s'atténue considérablement et de nouvelles bandes apparaissent, dont l'une correspondrait à la bande n° 4 de phosphorescence et deux autres pourraient correspondre (à 50 cm^{-1} près) aux bandes n° 5 et n° 6. Les flèches verticales sur la figure 16 représentent la situation des bandes de fluorescence enregistrées par CHPOLSKII (après translation de 10100 cm^{-1} vers l'infrarouge).

D'après ces derniers auteurs, il semble que la transition sans vibration 0 _ 0 se situe, en fluorescence, au niveau de la bande la plus intense. On peut donc penser qu'en phosphorescence la transition 0 _ 0 se situe également au niveau de la bande n° 1 qui lui correspond.

Dans des expériences ultérieures CHPOLSKII et GIRDJIIAOUSKAITE (43) ont montré que le spectre de fluorescence, à -190°C, du 3-4 benzopyrène, en solution dans l'octane normal, comporte de très nombreuses bandes. Ils ont pu déterminer avec précision les fréquences de vibration

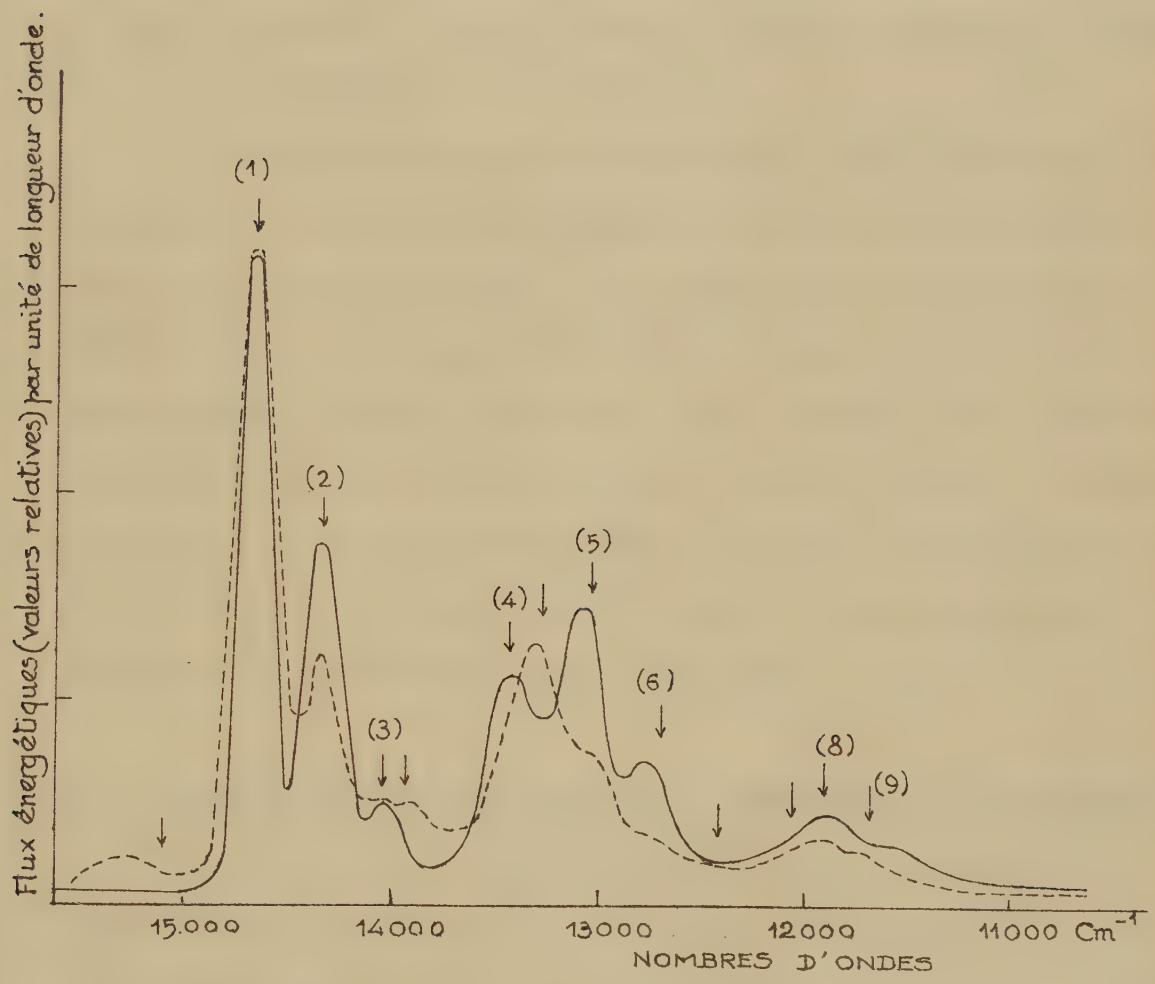


Figure 16 - Comparaison des spectres de phosphorescence et de fluorescence du 3-4 benzopyrène.

——— Spectre de phosphorescence à - 190° C.

------ Spectre de fluorescence à 20°C dans l'hexane (Le spectre à été translaté de 10.140 cm^{-1} vers l'infrarouge).

↓ Bandes de fluorescence à - 190°C. enregistrées par Chpolskii et Illina A.'. Journal Experimentalnoi i teoretitcheskoi Physiki 21, 142, 1951, (Les bandes ont été translatées de 10.000 cm^{-1} vers l'infra-rouge).

qui apparaissent dans ce spectre. Les fréquences 1240 cm^{-1} (nous trouvons 1250 cm^{-1}) et 337 cm^{-1} (nous trouvons 325 cm^{-1}) interviennent fréquemment pour expliquer la position des principales bandes. L'interprétation vibrationnelle de la situation des bandes du spectre de fluorescence qui correspondent aux 6 premières bandes de phosphorescence est la même que la nôtre. Cependant, pour les bandes qui semblent correspondre aux bandes 8 et 9, l'interprétation est différente.

Le fait qu'aux erreurs expérimentales près, des mêmes fréquences de vibration apparaissent dans le spectre de fluorescence et dans le "spectre rouge" de phosphorescence, est en accord avec l'attribution de ce dernier spectre à des transitions du 3-4 benzopyrène lui-même d'un de ces états excités à l'état fondamental. Comme la durée de vie de cet état excité est au moins de l'ordre de 1/1000 de seconde (puisque le phosphoroscope donne 25 interruptions par seconde) il s'agit très probablement d'un état triplet (le premier triplet, puisqu'on admet en général que seul cet état triplet donne lieu à de la luminescence) (35).

D/ - RECHERCHE DU SPECTRE D'ABSORPTION CORRESPONDANT AUX TRANSITIONS $S_o \rightarrow T_1$

Si le "spectre rouge" est dû à des transitions $T_1 \rightarrow S_o$, on doit pouvoir enregistrer un spectre d'absorption dû à des transitions $S_o \rightarrow T_1$, placé symétriquement au spectre "rouge" par rapport à la transition sans vibration $T_1 \rightarrow S_o$. LEWIS et KASHA ont montré que ces spectres d'absorption, en général difficilement décelables, apparaissent d'une façon sensible dans des solvants contenant des atomes lourds tels que l'iode (37).

Nous avons donc enregistré le spectre d'absorption sous 5 cm d'épaisseur, d'une solution de 3-4 benzopyrène "Eastman Kodak" à la concentra-

tion de 15 mg par cm^3 dans l'iodure d'éthyle. Ce spectre présente deux épaulements peu accentués, respectivement vers 14.500 ± 100 cm^{-1} et 16.000 ± 100 cm^{-1}. Ces deux épaulements disparaissent dans le spectre d'absorption d'une solution acétonique de même concentration, faite avec le résidu d'évaporation de la solution dans l'iodure d'éthyle (fig. 17).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus en phosphorescence, si l'on suppose que la transition électronique pure $T_1 \rightarrow S_o$ du 3- 4 Benzopyrène se situe au niveau de la bande n° 1 du spectre "rouge".

En effet, cette bande est à 14 670 A, donc presque en coïncidence avec la bande d'absorption à 14 500 cm^{-1}. D'autre part, l'écartement des deux bandes d'absorption est de 1500 ± 200 cm^{-1}, donc assez proche de l'intervalle séparant les deux principaux groupes de bandes de phosphorescence qui est de 1250 cm^{-1}.

Un autre moyen d'augmenter le coefficient d'absorption moléculaire du spectre dû aux transitions $S_o \rightarrow T_1$ est la mise des solutions sous pression d'oxygène. EVANS a appliqué cette technique au 3-4 benzopyrène,en solution dans le chloroforme (44). Il obtient des bandes assez fines qui lui permettent de localiser la transition 0 _ 0 à 14.670 cm^{-1}. Ce résultat est rigoureusement en accord avec notre interprétation, puisque nous localisons cette transition exactement à la même fréquence (bande n° 1 du spectre "rouge")(x).

E/ - <u>COMPARAISON AVEC UN RESULTAT THEORIQUE</u> :

HALL (41) a calculé théoriquement la hauteur du niveau premier triplet pour le 3-4 benzopyrène. Il donne 1,68 ev. Or, nous trouvons

---

(x) Bien que ce résultat ait été obtenu un peu avant le nôtre, nous n'en avions pas eu, alors, connaissance.

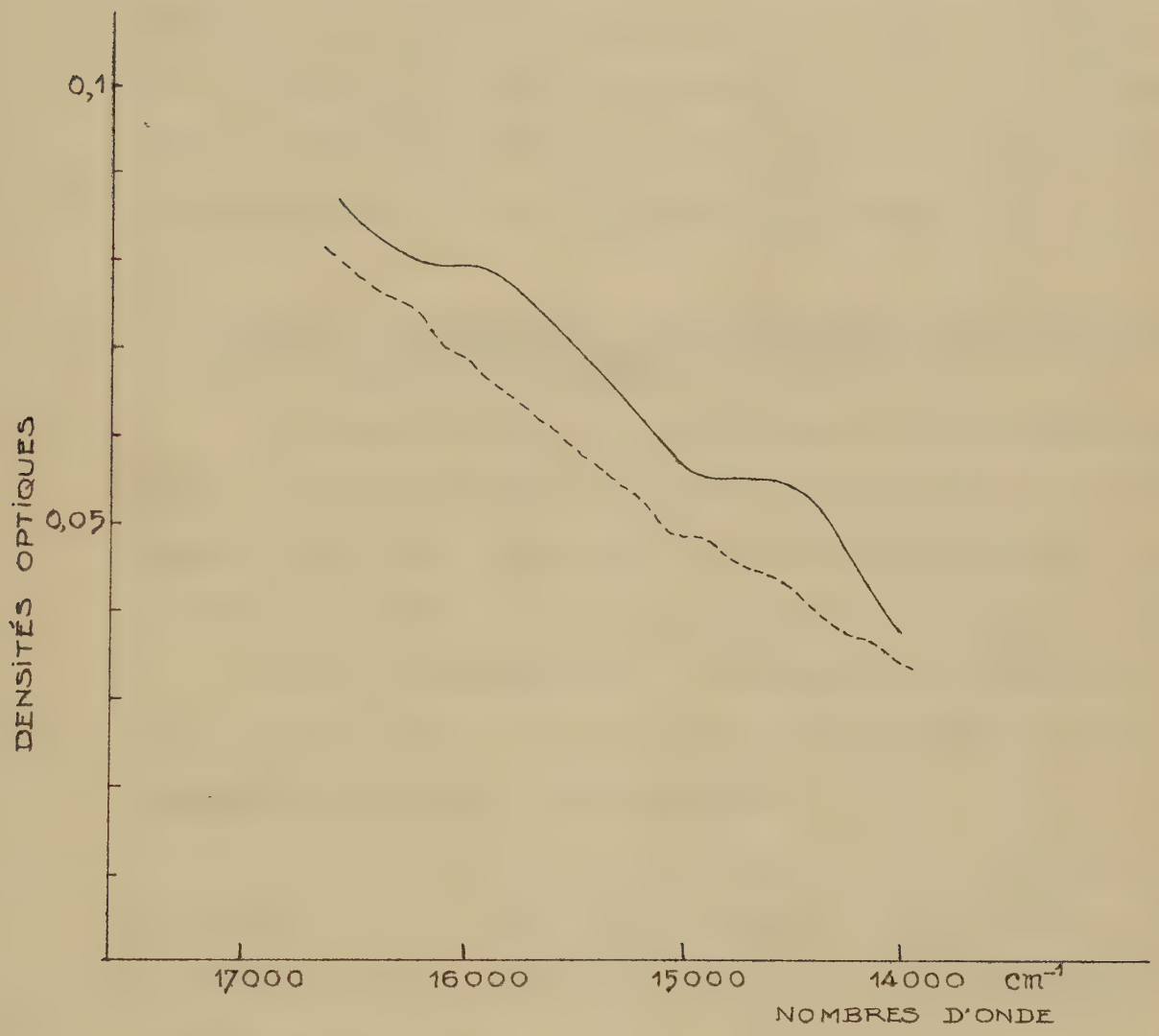


Figure 17 - Spectres d'absorption de solutions de 3-4 benzopyrène, à la concentration de 15 mg/cm^3, sous une épaisseur de 5 cm.

———— dans l'iodure d'éthyle

-------- dans l'acétone

14.670 cm^{-1} c'est-à-dire 1,82 ev. Les deux résultats ne diffèrent que de 8%, ce qui est un accord satisfaisant. Cet accord confirme que le niveau d'excitation qui donne lieu au spectre "rouge" est bien le premier triplet, puisque cette méthode de calcul a donné aussi pour d'autres hydrocarbures des résultats en bon accord avec l'expérience.

F/ - SPECTRE DE PHOSPHORESCENCE DU 3-4 BENZOPYRENE EN SOLUTION DANS L'ACIDE BORIQUE, A LA TEMPERATOIRE DU LABORATOIRE

Les solutions de 3-4 benzopyrène dans l'acide borique à la température du laboratoire donnent un spectre de phosphorescence assez proche du "spectre rouge", mais d'aspect plus diffus et ne présentant que trois larges bandes aux emplacements des trois systèmes de bandes décrits plus haut.

Pour le 3-4 benzopyrène de la Compagnie "Eastman Kodak", une bande faible et très large apparaît entre 5500 A et 6500 A, au lieu des deux décrites par ILINA et CHPOLSKII (38).

Dans cette dernière région spectrale, on observait, après chromatographie, une bande encore plus faible et plus large que pour le produit "Eastman Kodak". De plus, cette bande n'est pas décelable dans le "spectre visible n° 2".

Ceci semble indiquer que seule la partie du spectre des solutions boriques, comprise entre 6500 A et 10500 A, soit dûe au 3-4 benzopyrène, et que les bandes enregistrées par ILINA et CHPOLSKII aient été dues à des impuretés.

Les spectres des solutions boriques étaient d'ailleurs difficiles à enregistrer, en raison d'une photodestruction du produit, au cours des enregistrements. Cette photodestruction, non seulement abaissait l'intensité de la phosphorescence, mais encore colorait en rouge la solution borique irradiée.

G/ - CONCLUSION

L'ensemble des faits présentés nous permet d'affirmer que le "spectre rouge" que nous avons enregistré est dû à des transitions du premier triplet à l'état fondamental du 3-4 benzopyrène et que la transition sans vibrations est proche de la fréquence 14.670 cm^{-1}.

II - AUTRES SUBSTANCES

Sauf pour le pérylène, dont le cas sera examiné séparément, les hydrocarbures étudiés, cités plus haut, sont formés de 6 cycles benzéniques, alors que le 3-4 benzopyrène n'en comporte que 5. Or, l'augmentation du nombre de cycles aromatiques produit, en général, un effet bathochrome sur les spectres électroniques : on peut constater, par exemple, que les spectres d'absorption des hydrocarbures fondamentaux étudiés ici sont déplacés vers le rouge par rapport à celui du 3-4 benzopyrène (45). Donc le premier triplet des hydrocarbures à 6 cycles benzéniques devrait être plus bas que celui du 3-4 benzopyrène. Ceci est d'ailleurs confirmé par les calculs théoriques de HALL (41). Il convient donc de rechercher la phosphorescence due aux transitions $T_1 \rightarrow S_o$, pour ces substances comme pour le 3-4 benzopyrène, dans l'extrême-rouge et le proche infrarouge.

A/ - SOLVANTS

Le rendement de phosphorescence de certaines des substances étudiées semble assez bas. De plus, le rendement quantique de la cathode du photomultiplicateur sensible à l'infrarouge est beaucoup plus faible que celui du photomultiplicateur EMI sensible uniquement au visible (aux longueurs d'onde où ces derniers rendements sont maxima). C'est pourquoi il fallait au moins une concentration de 100 γ par cm^3 pour que le détec-

teur sensible à l'infrarouge donne des signaux aisément mesurables. Or, un certain nombre des composés étudiés (principalement les dérivés méthylés) ne peuvent être dissous, à cette concentration, dans l'alcool. Pour cette raison, nous avons utilisé le toluène comme solvant, malgré certains inconvénients qui seront mentionnés maintenant :

Le toluène se congèle différemment suivant les conditions de refroidissement. Si la solution est congelée très rapidement, elle gèle en verre transparent avec seulement quelques craquelures; si le refroidissement est plus lent, on obtient une masse de microcristaux.

On constate que les spectres de phosphorescence dépendant de la façon dont le toluène s'est congelé (figure 18). (Cette observation est à rapprocher de celle de KANDA et SPONER (46) qui ont trouvé des résultats non reproductibles dans le spectre de phosphorescence du toluène à -190°C). Il fallait donc toujours utiliser le même mode de congélation pour avoir des résultats reproductibles et comparables d'une substance à l'autre. L'étude de la couleur et des spectres de fluorescence des échantillons congelés dans des conditions variées (chapitre IV) permet de distinguer 3 formes différentes des solutions congelées. La forme que l'on pouvait obtenir le plus facilement exempte des autres formes, est celle ayant l'aspect d'un verre. Nous avons donc choisi d'enregistrer uniquement les spectres des solutions congelées sous cette forme.

Les techniques de congélation qui donnent des échantillons vitrifiés le plus fréquemment sont les suivantes :

Avec la cuve de cuivre, les meilleurs résultats sont obtenus en trempant cette dernière dans l'azote liquide, puis au moment où la température de la coupelle est très près de celle de l'azote liquide et qu'on commence à entendre un grésillement dû à une ébullition plus vive de l'azote, on verse rapidement et en une seule fois la solution qui gèle alors en verre dans plus de 50% des cas.

Les résultats sont plus constants avec un tube contenant la solution, que l'on trempe brusquement dans l'azote liquide et que l'on maintient dans l'azote liquide jusqu'à congélation.

Le toluène utilisé est du toluène commercial séché sur Cl_2Ca, redistillé à l'abri de la lumière, et conservé à l'obscurité. L'obscurité est nécessaire pour éviter la formation d'une impureté gênante par sa phosphorescence dans le visible et qui se produit par l'action de la lumière du jour sur le toluène liquide. Le spectre de phosphorescence de cette impureté, en solution dans le toluène congelé sous la forme de verre, est le même que celui publié par KANDA et SPONER (46), et attribué par ces auteurs à du benzaldéhyde formé par irradiation du toluène congelé. Nous n'avons pas constaté la formation de cette impureté par irradiation du toluène congelé à -190°C, même sous l'action du rayonnement total d'une lampe "SP 500 " montée avec une optique de silice fondue de qualité courante. D'après nos expériences, il semble que cette impureté ne se forme qu'à la température ordinaire.

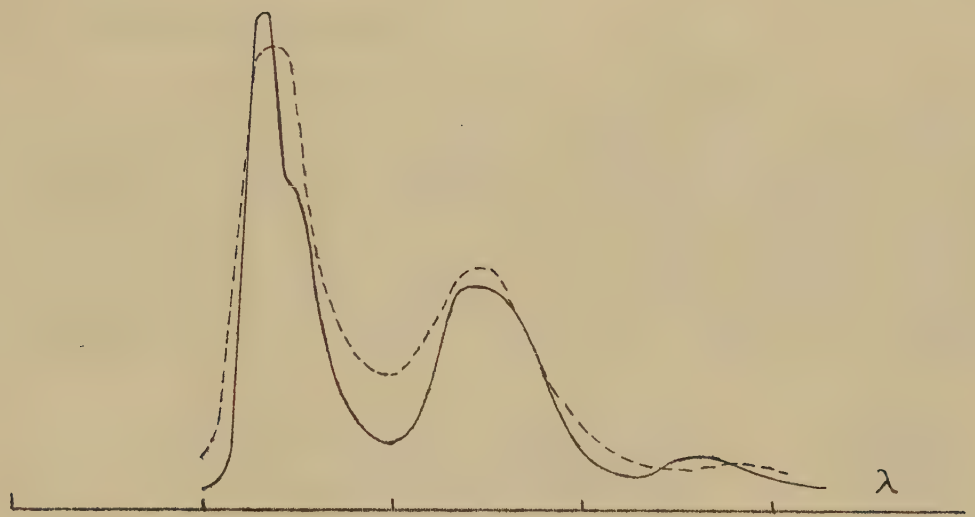


Figure 18 - Influence des conditions de congélation, sur le spectre de phosphorescence d'une solution de 3-4-8-9 dibenzopyrène dans le toluène à -190° C.

——— Solution gelée en verre.

– – – – – – Solution gelée en "cristaux" de fluorescence bleue.

En ordonnée : Flux d'énergie émis par unité de longueur d'onde (valeurs relatives).

B/ - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les substances étaient excitées par le rayonnement de la lampe "SP 500" filtré par du verre.

Les concentrations étaient de 100 γ par cm^3.

La largeur de bande isolée à 8000 A par le monochromateur variait depuis 70 A dans le cas le plus favorable (3-4-9-10 dibenzopyrène) à 250 A dans le cas le moins favorable (diméthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène); à 11 000 A, elle variait respectivement de 150 A à 500 A pour ces mêmes corps.

La précision sur les pointésdes maxima variait de $\pm$ 10 à $\pm$ 100 A suivant la région spectrale et la largeur des bandes.

La précision sur les ordonnées des courbes est de $\pm$ 5% environ.

C/ - SPECTRES D'ABSORPTION

Pour contrôler la pureté des échantillons que nous possédons, nous avons enregistré leur spectre d'absorption : Les hydrocarbures fondamentaux avaient un spectre en bon accord avec ceux reproduits dans le catalogue de FRIEDEL et ORCHIN (45). Pour les produits méthylés, les spectres obtenus étaient très semblables à ceux des produits non méthylés et n'en différaient que par des déplacement bathochromes. Ces déplacements sont les suivants, par rapport à l'hydrocarbure fondamental, pour la bande d'absorption intense de plus grande longueur d'onde (correspondant à la bande I dans la notation de JONES (47) pour le 1-2 benzanthracène) :

8-Méthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène	622 cm^{-1}
5-8 Diméthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène	1097 cm^{-1}
10 Méthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène	407 cm^{-1}
5-10 Diméthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène	800 cm^{-1}
6 Méthyl anthanthrène	415 cm^{-1}
6-12 Diméthyl anthanthrène	815 cm^{-1}

D/ - PARTIES DES SPECTRES DE PHOSPHORESCENCE ATTRIBUEES A DES TRANSITIONS DU PREMIER TRIPLET A L'ETAT FONDAMENTAL

Les parties des spectres de phosphorescence que nous attribuons à des transitions du premier triplet à l'état fondamental sont représentées sur la figure 19. Les longueurs d'onde et les fréquences des maxima sont inscrites dans le tableau I. On note , chez tous ces spectres, la présence de trois (ou deux) bandes ou groupes de bandes, d'intensité décroissant avec la fréquence et séparés par, à peu près, les mêmes intervalles de

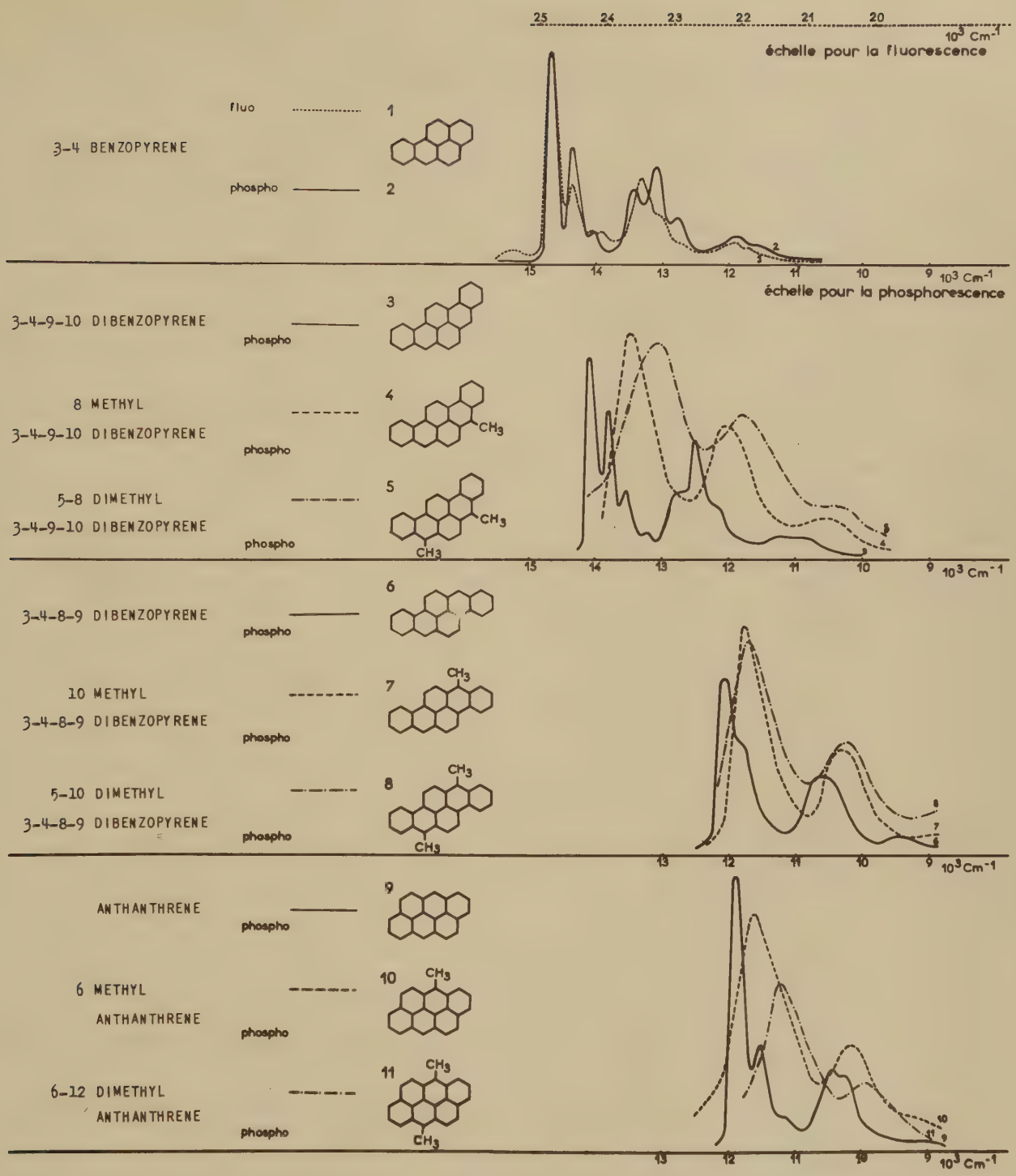


Figure 19 : Courbes spectrales d'énergie :

Phosphorescence d'hydrocarbures à 6 cycles benzènique, comparée à la phosphorescence et la fluorescence du 3-4 benzopyrène.

Phospho = phosphorescence à -190°C (le 3-4 benzopyrène est dissous dans l'éthanol et les autres substances dans le toluène.
Les concentrations sont de 100γ/cm³.

Fluo = fluorescence à la température du laboratoire (solution dans l'hexane à la concentration de 1γ/cm³.

L'échelle en cm^{-1}, pour le spectre de fluorescence, est déplacée de 10.140 cm^{-1} vers l'infrarouge par rapport à l'échelle pour les spectres de phosphorescence.

Tableau I

Maxima de phosphorescence (x)

	(Å)	n (cm^{-1})
3-4 benzopyrène	6.815	14.670
	6.975	14.340
	7.135	14.020
	7.455	13.410
	7.640	13.090
	7.835	12.760
	8.420	11.880
	(8.650)	(11.560)
3-4-9-10 dibenzopyrène	7.115	14.050
	7.260	13.770
	7.400	13.510
	7.575	13.200
	(7.812)	(12.800)
	8.020	12.470
	(8.230)	(12.150)
	8.900	11.240
	9.200	10.870
8-Méthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène	7.420	13.480
	8.320	12.020
	9.500	10.530
5-8 Diméthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène	7.660	13.050
	8.560	11.680
	9.620	10.400
3-4-8-9 dibenzopyrène	8.305	12.040
	(8.500)	(11.760)
	9.400	10.640
	10.600	9.430
10 Méthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène	8.515	11.740
	9.710	10.300
5-10 Diméthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène	8.560	11.680
	9.785	10.220
Anthanthrène	8.440	11.850
	8.700	11.490
	(9.000)	(11.110)
	9.600	10.420
	9.800	10.200
6-Méthyl anthanthrène	8.650	11.560
	9.900	10.100
6-12 Diméthyl anthanthrène	8.940	11.190
	10.070	9.930

(x) Les nombres entre parenthèses correspondent à des épaulements.

de fréquences (1200 cm^{-1} à 1500 cm^{-1}). Cette structure est celle rencontrée chez les spectres de fluorescence et de phosphorescence du 3-4 benzopyrène, que nous avons aussi reproduits sur la figure 19. Ces analogies sont plus apparentes sur la figure 20 où nous avons fait subir des déplacements aux spectres de la figure 19, de façon à ce que leurs bandes ou groupes de bandes correspondants coïncident.

La présence des mêmes intervalles de fréquence séparant les groupes de bandes s'explique en supposant que ce sont les mêmes niveaux vibrationnels de l'état fondamental qui prédominent chez toutes les substances étudiées, lors du retour à l'état fondamental, et que ces niveaux vibrationnels ont, à peu près, la même hauteur dans tous les cas. Cette supposition semble assez vraisemblable puisque les différentes substances ont des structures moléculaires assez semblables.

La décroissance de l'intensité des bandes avec la fréquence, qui est révélée par la représentation des spectres en unités énergétiques, s'explique par le principe de Franck et Condon, si on admet que la configuration des noyaux de ces composés dans l'état fondamental diffère peu de la configuration dans l'état excité premier triplet.

Les déplacements dûs à la méthylation, du même ordre de grandeur que ceux observés en absorption, sont des résultats attendus et confirment qu'il s'agit bien de spectres émis par les substances elles-mêmes et non par des impuretés éventuelles. Ces déplacements sont les suivants :

8 Méthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène	550 cm^{-1}
5-8 Diméthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène	980 cm^{-1}
10 Méthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène	320 cm^{-1}
5-10 Diméthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène	380 cm^{-1}
6 Méthyl anthanthrène	240 cm^{-1}
6-12 Diméthyl anthanthrène	540 cm^{-1}

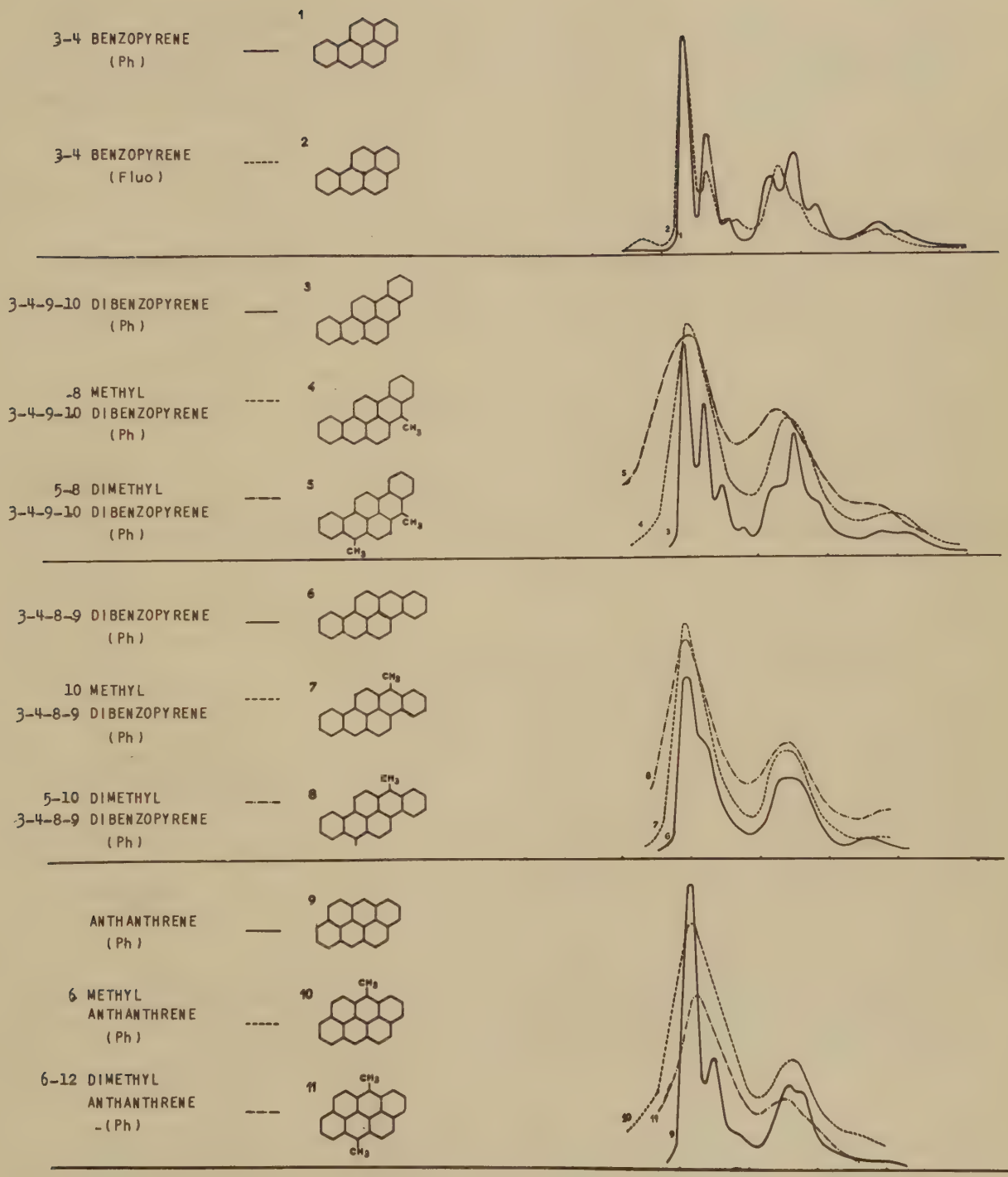


Figure 20 : Courbes de la figure 19 déplacées suivant l'axe des nombres d'ondes de façon à mettre en coïncidence les bandes ou groupes de bandes correspondants.

Ces déplacements sont mesurés par les translations, en nombre d'ondes, que l'on doit faire subir aux spectres des dérivés méthylés pour faire coïncider leurs trois (ou deux) bandes avec les trois (ou deux) groupes de bandes correspondants de l'hydrocarbure fondamental.

Le 3-4-8-9 dibenzopyrène, le 5-10 diméthyl 3-4-8-9 dibenzopyrène, le 8 méthyl 3-4-9-10 dibenzopyrène et le 6 méthyl anthanthrène ont été chromatographiés, sans qu'en résultent de changements dans les spectres de la figure 19. Les chromatographies étaient faites selon la technique n° 1 décrite plus haut.

Comme pour le 3-4 benzopyrène, la distance de ces spectres aux spectres de fluorescence correspondants, d'environ 10.000 cm^{-1}, indique qu'il s'agit probablement de transitions $T1 \rightarrow So$. Voici ces distances en cm^{-1} :

Substance	Fluorescence, (1° singulet)	Phosphorescence (1° triplet)	Différence
3-4 Benzopyrène	24814 cm^{-1}	14670 cm^{-1}	10144 cm^{-1}
3-4-9-10 Dibenzopyrène	23170 -	14050 -	9120 -
3-4-8-9 Dibenzopyrène	22183 -	12040 -	10143 -
Anthanthrène	23250 -	11850 -	11400 -

Dans ce tableau, la hauteur du premier singulet est supposée égale à la fréquence de la bande intense de plus grande fréquence du spectre de fluorescence (x). La hauteur du premier triplet est supposée égale à la bande de plus grande fréquence du spectre de phosphorescence $T _ S$ (tableau 1)

On constate, sur ce tableau, que les premiers triplets des trois hydrocarbures à 6 cycles sont plus bas que le premier triplet du 3-4 benzopyrène. Il s'agit du déplacement bathochrome signalé plus haut, dû à

(x) Ces données sont relevées sur le tableau IV, sauf pour le 3-4 benzopyrène (tableau III, colonne "présent travail") et l'anthanthrène (23)

l'augmentation du nombre des cycles aromatiques dans une série d'hydrocarbures analogues. L'existence de ce déplacement confirme notre interprétation.

HALL a calculé la hauteur du 1° triplet des trois hydrocarbures fondamentaux étudiés ici (41). Nous les donnons ci-dessous, en regard des hauteurs expérimentales obtenues en supposant que pour chaque substance la transition 0 _ 0 se situe au sommet de la bande intense de plus grande fréquence.

	3-4-9-10 dibenzopyrène	3-4-8-9 dibenzopyrène	Anthanthrène
Calculé (électronvolt)	1,55	1,37	1,32
Expérimental "	1,74	1,49	1,47
Différences relatives (%)	5,5	8,5	10,7

L'accord est donc satisfaisant. C'est en même temps une confirmation de nos résultats et une vérification de la méthode de calcul de HALL, qui n'avait été jusqu'à présent vérifiée que pour les hydrocarbures de plus petit poids moléculaire phosphorescents dans le visible. Dans tous les cas, la méthode donne une précision de ± 10% environ. Pour les hydrocarbures que nous avons étudiés, les résultats théoriques diffèrent par défaut des résultats expérimentaux.

E/-CAS DU PERYLENE

Le produit commercial donnait en solution dans le toluène un spectre de phosphorescence dans le visible conduisant à une énergie de transition sans vibration de 2 ev (6200 A).

Le méthyl-3-pérylène ne donnait pas de spectre présentant un déplacement bathochrome par rapport au précédent.

D'autre part, HALL donnait 1,57 ev. pour la hauteur du niveau premier triplet du pérylène, ce qui correspond à 7890 A (48).

Ce résultat est vérifié par la détermination de BIRKS (49), de la hauteur du premier triplet du pérylène, par absorption en présence d'oxygène sous pression. Il donne 1,55 ev.

En raison de ces contradictions, nous avons chromatographié le pérylène. Il se sépare une impureté donnant le spectre de l'échantillon commercial. L'échantillon purifié donne un fond continu assez faible dans le visible et aucune phosphorescence décelable entre 7000 A et 11000 A.

La phosphorescence due aux transition $T_1 \rightarrow S_o$ du pérylène est donc probablement trop faible ou de décroissance trop rapide pour que nous ayons pu l'enregistrer. Le fond continu émis dans le visible par le produit purifié est sans doute dû à des impuretés non séparées ou à des substances étrangères apportées par la chromatographie.

Note :

Ce travail a été entrepris afin de rechercher des corrélations éventuelles entre la hauteur du niveau premier triplet des hydrocarbures aromatiques et leur activité cancérigène.

L'idée qui nous guidait était analogue à celle développée par BIRKS (25) (chapitre I). C'est la possibilité de l'intervention de transferts d'énergie d'excitation dans le processus conduisant au déclanchement du cancer.

Il semblait inutile, pour la recherche d'une corrélation éventuelle avec l'activité cancérigène, de mesurer expérimentalement la hauteur du premier triplet de tous les principaux hydrocarbures. Cette recherche pouvait être faite à partir des résultats calculés par HALL, pour de nombreux hydrocarbures non étudiés expérimentalement. En effet, la méthode

de calcul de HALL parait, à présent, vérifiée dans un domaine assez étendu d'énergies, et sa précision semble suffisante.

Pour 45 hydrocarbures aromatiques ayant 4 à 6 noyaux benzéniniques, il s'est avéré qu'aucune corrélation immédiatement visible et bien nette entre la hauteur du premier triplet et l'activité cancérigène ne se manifestait.

Des corrélations entre le déplacement spectral, dû à la méthylation, et l'activité cancérigène avaient été signalées par MOODIE et REID (24). Nous n'avons pas du tout retrouvé ces corrélations pour les hydrocarbures que nous avons étudiés expérimentalement.

III - DETECTION DES HYDROCARBURES PAR PHOSPHORESCENCE

A/ - 3-4 BENZOPYRENE

Le 3-4 benzopyrène peut être détecté par son spectre de phosphorescence décrit plus haut. La quantité minimum que l'on peut détecter en solution dans l'alcool est de l'ordre de 10 γ /cm3.

Dans l'analyse qualitative du 3-4 benzopyrène, cette détection peut fournir un critère d'identification supplémentaire à ceux déjà obtenus en fluorescence et en absorption. Ainsi, dans l'analyse de fumée de papier à cigarette (brûlé dans un tube de verre) nous avons pu détecter un certain nombre de bandes de phosphorescence du 3-4 benzopyrène : la figure 21 représente le spectre de phosphorescence d'une solution alcoolique d'un échantillon obtenu à la fin des fractionnements et dont les spectres de fluorescence et d'absorption indiquaient la présence d'une assez grande proportion de 3-4 benzopyrène. 3 bandes du 3-4 benzopyrène apparaissent nettement.

B/ - AUTRES SUBSTANCES

Le tableau suivant concerne quelques composés apparentés à des substances que nous recherchions dans la peau de souris après badigeon-

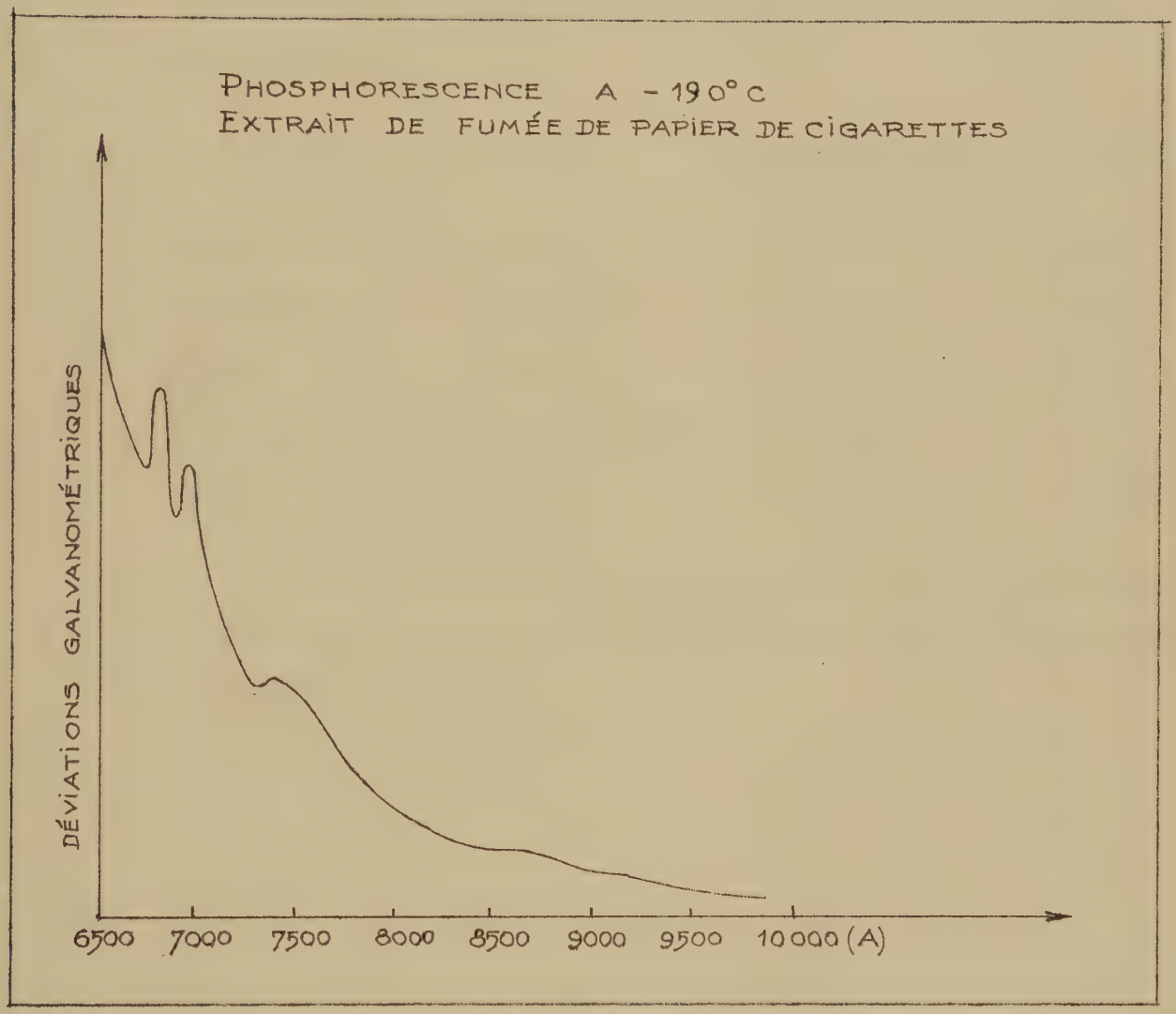


Figure 21 - Détection du 3-4 benzopyrène par son spectre de phosphorescence.

nage par certains hydrocarbures. Nous donnons la limite inférieure de concentration à laquelle on peut détecter leurs principales bandes de phosphorescence.

Substance	Solvant	Longueurs d'ondes excitatrices	Sensibilité
Naphtalène	Pentane	$\lambda > 2300$ A	5/100 γ/cm3
Phénanthrène	Hexane	$\lambda > 2300$ A	1/100 "
P.D.A. (x)	Ether	$\lambda > 2300$ A	5/100 "
Chrysène	Acétate d'éthyle	$\lambda > 2300$ A	1/10 "
Picène	Pentane	$\lambda > 2800$ A	2/1000 "

Avec le naphtalène et le picène, les spectres doivent être enregistrés assez rapidement pour éviter une photolyse trop importante de ces substances.

(x) Diacide du 2-phényl-phénanthrène, substance qui a été trouvée liée aux protéines de la peau de souris après badigeonnage de celle-ci par du 1-2-5-6 dibenzanthracène (50).

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur C. HEIDELBERGER d'avoir bien voulu nous procurer un échantillon de ce composé.

CHAPITRE IV

FLUORESCENCE RETARDEE

I - HISTORIQUE

La fluorescence retardée des colorants en solution solide est connue depuis longtemps (36). C'est JABLONSKI (51) en 1935 qui donna un schéma théorique pour l'expliquer. Il supposait l'existence d'un état métastable. La fluorescence retardée serait due au retour des molécules de cet état métastable, par chocs thermiques, à l'état qui est atteint directement par absorption (x). LEWIS LIPKIN et MAGEL (52) en 1941 par la mesure des variations, en fonction de la température, de la constante de temps et de la fluorescence retardée de la fluorescéine, dans un domaine de température où la dépopulation de l'état métastable se fait principalement par le mécanisme de fluorescence retardée, ont déterminé l'énergie d'activation du phénomène. Ils ont trouvé qu'elle était égale à la différence des énergies de l'état qui donne lieu à la fluorescence et de celui qui donne lieu à la luminescence lente, dont le rayonnement est situé à des longueurs d'ondes plus grandes. Donc l'état métastable impliqué dans la fluorescence retardée est probablement le même que celui qui donne lieu à la luminescence lente de grandes longueurs d'ondes. Ceci est confirmé par l'égalité

(x) Dans l'ancienne nomenclature, ce phénomène était appelé "phosphorescence vraie".

des constantes de temps expérimentales des deux phénomènes, mesurées à la même température (36 p. 444). C'est LEWIS et KASHA (35) qui identifièrent cet état métastable à l'état premier triplet, en 1944, et nommèrent cette fluorescence retardée "phosphorescence α ".

Pour les hydrocarbures, on n'avait pas mis en évidence de phosphorescence α à la température du laboratoire et à des températures inférieures (36 p. 443), ce qui était attribué à la trop grande différence d'énergie entre les niveaux 1S et 1T de ces composés; la probabilité d'atteinte du niveau 1S à partir du niveau 1T, par simples chocs thermiques, est alors très faible.

En 1949 KASHA et NAUMAN (34) ont observé, pour le naphtalène en solution congelée, une photoluminescence dont la durée de vie est de l'ordre de 3.10^{-5} s. ($3,3.10^{-6}$, d'après les mesures plus récentes (53) de MARTINEZ), et dont le rayonnement a la même composition spectrale que la fluorescence. Ici le phénomène serait une fluorescence vraie. L'état 1S du naphtalène aurait une durée de vie de 10^{-5} à 10^{-6} s. Ceci concorde avec la valeur calculée (10^{-6} s.) d'après le coefficient d'absorption correspondant à des transitions $So \rightarrow S1$.

DIKOUN (54) en 1950, observe une fluorescence retardée du phénanthrène en phase vapeur. Il a été montré, par la suite que cette émission est une émission de l'anthracène, impureté constamment présente dans les échantillons de phénanthrène, et serait dûe à un transfert d'énergie d'excitation du phénanthrène à l'anthracène (55).

En 1958, WILLIAMS (56) observe la fluorescence retardée de plusieurs hydrocarbures aromatiques en phase vapeur et en donne une interprétation basée sur la formation de dimères excités entre une molécule d'hy-

drocarbure dans son état fondamental et une molécule excitée dans son état premier singulet. Ce dimère se formerait par collisions, après l'excitation de molécules d'hydrocarbure, dans leur état premier singulet. Un choc d'une molécule non excitée sur ce dimère, lui soustrairait un supplément d'énergie vibrationnelle résultant de la formation de la liaison; ce dernier processus fournirait un dimère qui aurait une durée de vie de l'ordre de la milliseconde. Ce dimère serait alors scindé par de nouveaux chocs moléculaires en fournissant une molécule excitée dans son état premier singulet. Cette dernière émettrait alors un photon de fluorescence retardée.

Cette interprétation était suggérée par les études de FORSTER en 1955 (57) sur la bande de luminescence très large et de grandes longueurs d'ondes, qui apparaît à forte concentration dans les solutions d'hydrocarbures aromatiques. FORSTER a attribué cette bande à l'émission d'un dimère excité, formé par une molécule d'hydrocarbure dans l'état fondamental et une molécule dans l'état excité premier singulet. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été contestée par FERGUSON (58). Il suggère que le spectre observé par FORSTER puisse être dû à l'émission d'une paire d'ions formés à la suite de l'excitation d'une molécule.

STEVENS (59) a confirmé l'interprétation de WILLIAMS, en 1960 et en 1961, en montrant qu'une partie de l'émission de luminescence de grandes longueurs d'ondes de solutions concentrées de pyrène à la température ordinaire, a une durée de vie de 5.10^{-4} s. Mais il est difficile d'expliquer pourquoi une partie importante de l'énergie émise aux grandes longueurs d'ondes décroit beaucoup plus rapidement, après l'interruption du faisceau d'excitation.

L'émission de fluorescence retardée par des cristaux d'hydrocarbures aromatiques purs a été trouvée indépendamment par BLAKE (60) et SPONER (61), en 1958, avec le naphtalène. Leurs résultats diffèrent, en certains points, notamment sur l'effet de la purification du naphtalène sur l'intensité de la fluorescence retardée et sur le domaine de température dans lequel l'observation est possible, si bien qu'il ne s'agit peut-être pas du même phénomène. La décroissance de l'émission observée par BLAKE n'est pas exponentielle, ce qui implique un mécanisme assez complexe. Cet auteur a jugé prématuré de proposer une interprétation au phénomène. SPONER propose, pour expliquer la fluorescence retardée qu'elle a observée, l'intervention d'électrons de photoconductivité qui emmagasineraient l'énergie d'excitation et pourraient la restituer aux molécules de naphtalène, après un certain temps. Mais il faudrait, ici, tenir le plus grand compte de ce que la fluorescence des échantillons cristallisés de naphtalène, même très purifiés, est due en partie à des impuretés difficiles à éliminer complètement (62).

En 1959 ROUSSET (63) a démontré que la fluorescence de l'anthracène en solution dans le naphtalène, due aux transferts d'énergie d'excitation du naphtalène à l'anthracène, est une fluorescence retardée. Ce phénomène semble assez proche de celui que nous avons observé pour des solutions congelées de 3-4 benzopyrène.

En 1962 PARKER et HATCHARD (64) ont observé une fluorescence retardée de solutions dégazées d'anthracène et de phénanthrène à la température ordinaire. L'intensité de cette émission est proportionnelle au carré de l'éclairement d'excitation. Ces auteurs ont émis l'hypothèse, pour expliquer ce résultat, que la fluorescence retardée provient de l'interac-

tion de deux molécules dans l'état premier triplet; cette interaction conduirait à la formation d'un dimère qui, à la suite d'un réarrangement électronique et une séparation des constituants du dimère, fournirait une molécule dans l'état excité premier singulet, et une molécule dans l'état fondamental. Il n'est alors plus nécessaire d'admettre que le dimère formé ait une durée de vie importante, la durée de vie du phénomène étant déterminée par celle de l'état premier triplet.

L'étude de la fluorescence retardée des solutions congelées de 3-4 benzopyrène, nous a conduit à formuler, indépendamment de ces auteurs, une hypothèse analogue (x).

II - DESCRIPTION DU PHENOMENE ETUDIE ET INFLUENCE DE DIVERSES CONDITIONS EXPERIMENTALES (xx)

A/ - INTRODUCTION

Pour les hydrocarbures aromatiques dont nous avons étudié la phosphorescence T _ S, on enregistre en solution à - 190°C, en plus des bandes dont il a été question dans le chapitre précédent, un spectre à des longueurs d'ondes plus courtes.

(x) En effet, nous n'avons eu connaissance de l'article de PARKER et HATCHARD que quelques jours avant de donner notre manuscrit à publier.

(xx) Pour les expériences décrites dans ce chapitre, les luminescences sont excitées, sauf indication contraire, par le rayonnement d'une lampe S.P. 500, filtré par 4 mm. de verre ordinaire (verre du vase Dewar) ou par un filtre "rénovic" de "Sovirel" de 2 mm. d'épaisseur dans le cas de l'utilisation d'un vase Dewar en quartz. Les rayonnements de longueurs d'ondes inférieures à 3000 A sont donc éliminés.

La concentration des solutions, est, en général, de 1300 γ /cm3.

Ce spectre comporte, en général, un fond continu et des bandes, qui n'apparaissent souvent que sous la forme d'épaulements, mais parfois émergent nettement du fond continu. Or certaines de ces bandes se trouvent exactement aux mêmes longueurs d'ondes que les bandes de fluorescence de l'hydrocarbure.

Ce dernier point a été constaté pour les hydrocarbures suivants: 3-4 benzopyrène, 1-2 benzopyrène, 1-2-5-6 dibenzanthracène, 20 méthyl cholanthrène, 3-4-8-9 dibenzopyrène et deux de ses dérivés méthylés, anthanthrène et deux de ses dérivés méthylés.

Dans la plupart des cas, la purification par chromatographie n'apportait aucune information concernant l'attribution de ces émissions au principal constituant de la substance dissoute. En effet, le fond continu de phosphorescence apparaissant après chromatographie aurait complètement masqué ces émissions si elles avaient persisté, puisque leur intensité était très faible dans les conditions utilisées systématiquement (100 γ par cm3).

Dans le cas du 3-4 benzopyrène, cependant, on pouvait apercevoir, après chromatographie, deux bandes, aux longueurs d'ondes de bandes de fluorescence.

L'étude a donc été poursuivie avec cette substance. Nous montrerons que l'utilisation de solutions plus concentrées permet de mieux définir le phénomène dont nous présenterons ensuite une étude expérimentale détaillée afin d'en chercher une interprétation.

B/ - QUASI-IDENTITÉ DU SPECTRE DE LA FLUORESCENCE RETARDEE ET DU SPECTRE DE FLUORESCENCE PROPREMENT DITE.

Si, au lieu d'enregistrer les spectres de phosphorescence du 3-4 benzopyrène pour les solutions alcooliques à 100 γ par cm3 comme nous

le faisons habituellement, on enregistre les spectres de solutions plus concentrées (1000 γ par cm3) le phénomène qui avait été entrevu avec les solutions diluées se manifeste nettement. Entre 3900 A et 4500 A, le spectre de luminescence lente devient pratiquement identique à celui de la fluorescence. Sur la figure 22 sont représentés les spectres de fluorescence (spectre A) et de luminescence lente (spectre B) d'un échantillon congelé à -190° C d'une solution alcoolique de 3-4 benzopyrène (Eastman Kodak) à la concentration de "1000" "par" cm3. Les largeurs des fentes du monochromateur et la position de l'échantillon sont inchangées d'un enregistrement à l'autre. D'après notre nomenclature, l'émission lente est une fluorescence retardée.

Le spectre émis peut varier notablement d'un échantillon congelé à l'autre et les rapports des hauteurs des différentes bandes peuvent changer considérablement, bien que leur longueur d'onde soit toujours la même. Notamment, la bande à 4030 A peut dans certains échantillons ne se manifester que par un épaulement, alors que dans d'autres elle est la plus intense. Il est probable que ceci est dû au moins en partie à la réabsorption du rayonnement de luminescence par la solution elle-même. En effet, l'importance de cette réabsorption peut varier considérablement suivant que l'échantillon est fortement craquelé ou non, ce qui peut modifier la longueur du trajet des rayons de fluorescence dans la solution. Or, un tel phénomène devrait influencer préférentiellement l'intensité de la bande de fluorescence de plus courte longueur d'onde puisque le chevauchement du spectre d'absorption et de fluorescence se produit surtout dans cette région. En fait, c'est ce qui est observé.

La déviation maximale, obtenue au galvanomètre, varie d'un échantillon congelé à l'autre (dans un rapport le plus souvent inférieur à 2). Ceci n'a pas lieu de surprendre, toujours pour la même raison d'inhomogénéité des échantillons congelés. Le manque de reproductibilité de l'intensité de luminescence des solutions congelées, sera d'ailleurs étudié en détail au chapitre V.

Enfin, il arrive parfois que l'on obtienne des échantillons congelés "anormaux" ne donnant pas de fluorescence retardée et une luminescence $T \rightarrow S$ très faible. Ceci est probablement dû à l'existence de plusieurs formes de congélation de l'alcool.

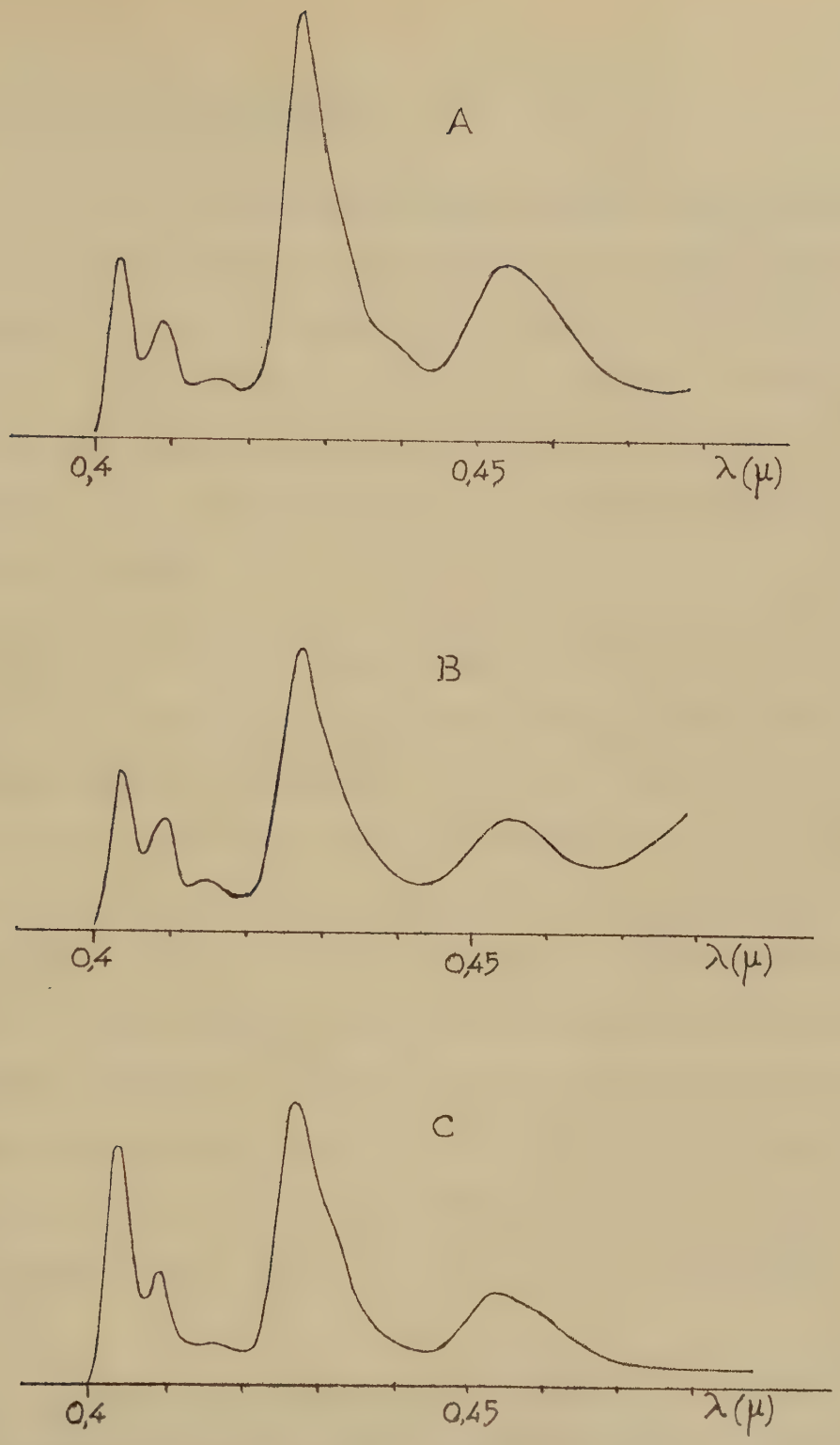


Figure 22 : Comparaison des spectres de fluorescence vraie et de fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène

A : Fluorescence vraie d'un échantillon congelé à -190°C d'une solution à 1000 γ /cm3 de 3-4 benzopyrène dans l'alcool.

B : Fluorescence retardée du même échantillon dans les mêmes conditions.

C : Fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène, excité indirectement par l'intermédiaire de l'éosine.

En ordonnée : Déviations du galvanomètre.

C/ - INFLUENCE DES IMPURETES

1° - Le 3-4 benzopyrène de la compagnie "Eastman Kodak" et celui de la compagnie "Fluka" donnaient en moyenne les mêmes intensités de fluorescence retardée (solutions à 1300 γ par cm3 dans l'alcool, à -190°C). Comme il a été remarqué que ces deux échantillons contenaient des impuretés donnant des spectres de phosphorescence différents entre 5000 A et 6000 A, il semble que ces impuretés phosphorescentes n'interviennent pas dans le phénomène observé.

2° - Pour s'en assurer et pour rechercher si d'autres impuretés éventuelles n'entrent pas en jeu, nous avons chromatographié du 3-4 benzopyrène selon la technique n° 2 décrite au chapitre II. Le 3-4 benzopyrène obtenu après chromatographie et avant cristallisation donnait une intensité de fluorescence retardée du même ordre que celle des échantillons commerciaux. Ceci confirme que les impuretés phosphorescentes entre 5000 et 6000 A, éliminées par la chromatographie, n'interviennent pas dans le phénomène. Cependant après une cristallisation dans l'éther, on n'obtenait plus qu'une intensité de fluorescence retardée égale au tiers de celle des autres échantillons. Il se peut donc que la recristallisation dans l'éther élimine une impureté qui joue un rôle dans le phénomène de fluorescence retardée.

Néanmoins on constate que les cristaux de 3-4 benzopyrène chromatographié et purifié sont colorés en jaune brun, alors que les cristaux de benzopyrène commercial sont d'un jaune beaucoup plus clair. Ceci montre que l'échantillon que nous avons préparé contient certaines impuretés qui sont absentes ou présentes en quantité moindre dans les échantillons commerciaux. Ces impuretés ont probablement été apportées par la chromatographie et ont peut être été transformées pendant le séjour de la solution dans le coffre à glace carbonique, en présence du gaz carbonique dissous dans la solution.

Il en résulte qu'on ne sait pas si la diminution de fluorescence retardée constatée après cristallisation est due à l'élimination d'impuretés ou à l'apparition de nouvelles impuretés.

La recristallisation, dans les mêmes conditions que précédemment, d'un échantillon commercial, ne produisait d'ailleurs aucune diminution de l'intensité de fluorescence retardée.

3° - En conclusion, les résultats sont plutôt en faveur d'un mécanisme ne nécessitant pas la présence des impuretés contenues dans nos échantillons de 3-4 benzopyrène.

D/ - INFLUENCE DES SOLVANTS ET DE LEURS FORMES DE CONGELATION

1° - Xylène

Du 3-4 benzopyrène dissous dans le xylène du commerce (mélange des trois isomères), à la concentration de 1000 γ /cm3, donne à -190°C une intensité de fluorescence retardée du même ordre que celle obtenue dans l'alcool, dans les mêmes conditions.

2° - Toluène

Une solution de 3-4 benzopyrène dans le toluène congelé à -190°C sous la forme de verre (chapitre III, paragraphe II) a donné une intensité de fluorescence retardée un peu moindre que celle obtenue avec les solutions alcooliques dans les mêmes conditions. L'échantillon transparent a été transformé, par réchauffement, en une masse d'aspect polycristallin, puis refroidi à -190°C ; l'intensité de la fluorescence est alors devenue 10 fois plus grande qu'avec l'échantillon transparent.

3° - Iodure d'éthyle

L'influence de l'iodure d'éthyle a été étudiée plus particulièrement, puisqu'on sait que ce solvant diminue la durée de vie des états triplets et augmente les probabilités de transitions des états triplets aux états singulets et les transitions inverses.

Nous avons comparé la luminescence à -190°C du 3-4 benzopyrène en solution à 1000 γ /cm3, dans les deux solvants suivants : d'une part un mélange à parties égales d'alcool et d'éther, d'autre part un mélange à parties égales d'alcool, d'éther et d'acétate d'éthyle (ces deux solvants forment des verres par congélation à -190°C).

On a constaté que l'iodure d'éthyle provoque :

- une diminution peu accusée (1/4 en moins) de l'intensité de phosphorescence $T \rightarrow S$.

- une très forte diminution de l'intensité de la fluorescence retardée (elle est divisée par 10 au moins)

- une diminution appréciable de l'intensité de fluorescence proprement dite (elle est divisée par 5).

4° - Acétone

Du 3-4 benzopyrène (Eastman Kodak) en solution dans l'acétone à 15 mg. par cm3, à -190°C, donne une fluorescence retardée à peine décelable.

A la congélation de cette solution, on observe la formation de nombreux cristaux de 3-4 benzopyrène, qui ne se dissolvent pas immédiatement quand on fait fondre l'échantillon. Ces cristaux donnent une fluorescence verte très intense à l'échantillon congelé.

5° - Dioxanne

Nous n'avons décelé aucune fluorescence retardée d'une solution à 1300 γ /cm3 de 3-4 benzopyrène (Fluka) dans le dioxanne entre -190°C et - 130° C.

Dans ce cas, comme dans le précédent, on observe la précipitation de cristaux de 3-4 benzopyrène, à la congélation de la solution.

6° - Octane

Une solution dans l'octane à 1000 γ par cm3 n'a pas donné de fluorescence retardée à -190°C.

7° - Conclusion

Bien que la fluorescence retardée ne se produise pas dans tous les solvants, ce phénomène ne semble pas être dû à une interaction d'un type particulier avec un groupe de solvants déterminé puisque deux solvants aussi différents que l'alcool et le xylène permettent sa manifestation.

D'autre part, l'apparition de la fluorescence retardée ne semble pas nécessairement liée à l'apparence cristalline des solvants congelés puisque l'alcool, qui se congèle sous l'apparence d'un verre et la forme gelée en verre du toluène donnent lieu à de la fluorescence retardée aussi bien que l'une des formes gelées en cristaux du toluène.

Les craquelures apparaissant le plus souvent dans les échantillons à la congélation, ne semblent pas nécessaires puisqu'il arrive que certains échantillons alcooliques soient parfaitement transparents (ils ne comportent que quelques craquelures localisées près du fond de la cuve, au contact du cuivre) et donnent une fluorescence retardée aussi intense qu'habituellement.

E/ - INFLUENCE DES CRISTAUX DE 3-4 BENZOPYRENE POUVANT PRECIPITER AU REFROIDISSEMENT DE LA SOLUTION.

Comme les solutions utilisées sont très concentrées et même souvent sursaturées, à la température du laboratoire, on peut se demander si la pré-

cipitation de cristaux de 3-4 benzopyrène n'est pas un élément nécessaire à l'apparition du phénomène.

On doit constater, tout d'abord, que les solutions alcooliques les plus concentrées, congelées assez rapidement, sont, bien que plus ou moins craquelées, parfaitement transparentes et que l'observation en lumière de Wood ne permet pas de voir la fluorescence jaune, verte ou bleue très intense des diverses formes cristallines du 3-4 benzopyrène (65).

Cependant on pouvait craindre la précipitation de très petits cristaux, invisibles à l'oeil nu. On a donc congelé une solution alcoolique très concentrée, en des temps de plus en plus longs. On ne décelait aucune différence significative dans l'intensité de la fluorescence retardée des échantillons congelés très rapidement et des échantillons congelés très lentement. Ce n'est que lorsque la congélation est très lente (plus de 5 minutes) et qu'apparaît une grande quantité de cristaux visibles à l'oeil nu, qu'on observe une diminution de la fluorescence retardée. Cette diminution peut atteindre une réduction au tiers, de l'intensité. Elle est probablement due, d'une part au fait que la concentration de la solution diminue lorsque du 3-4 benzopyrène précipite (or il sera vu plus loin que l'intensité de fluorescence retardée diminue lorsque la concentration du benzopyrène diminue) et, d'autre part, à l'effet d'écran formé par les cristaux à la lumière excitatrice.

Une diminution du même ordre a été constatée pour une solution saturée de 3-4 benzopyrène, dans laquelle on a ajouté des cristaux de 3-4 benzopyrène et que l'on a congelée rapidement.

Il semble donc, bien qu'on n'en ait pas la preuve formelle, que la précipitation de cristaux de 3-4 benzopyrène au sein de la solution ne

soit pas nécessaire à l'apparition de la florescence retardée.

F/ - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

1° - Observations

a) Si on congèle à -190°C une solution de 3-4 benzopyrène dans le xylène et si l'on fait monter progressivement sa température d'environ un degré par minute depuis -190°C jusqu'à -100°C (avec le dispositif à température variable décrit au chapitre II), l'intensité de la fluorescence retardée croit lentement jusqu'à environ -150°C puis plus rapidement de -150°C à -140°C et enfin décroit fortement à des températures plus élevées.

A son maximum (vers -140°C), cette intensité devient très élevée, jusqu'à plusieurs centaines de fois plus forte qu'à -190°C. Elle atteint alors environ 1/700° de l'intensité de la fluorescence vraie (compte tenu des différences dans les procédés d'excitation) et le nombre de photons émis par seconde est environ 50 fois plus grand que celui des photons de luminescence $T \rightarrow S$.

L'intensité de la luminescence $T \rightarrow S$ diminue progressivement quand la température augmente. Cette diminution semble plus rapide vers les températures un peu inférieures à -140°C. Dans une expérience, on a observé un minimum peu accentué de l'intensité de la luminescence $T_1 \longrightarrow S_o$ à la température à laquelle la fluorescence retardée était maximale. Dans d'autres expériences, ce dernier phénomène n'a pas été observé aussi nettement.

b) En solution dans l'alcool, on a observé aussi un maximum de l'intensité de la fluorescence retardée vers -140°C, mais l'augmentation est un peu moindre que dans le cas du xylène. A -140°C, la fluorescence retardée,

dans l'alcool, est environ 100 fois plus forte qu'à -190°C. Il y a alors environ 15 fois plus de photons émis en fluorescence retardée qu'en luminescence T → S.

Les variations de l'intensité de fluorescence retardée, en fonction de la température, sont à peu près réversibles. C'est à dire que si, à partir d'une température donnée de l'échantillon en observation, une augmentation de la température fait augmenter l'intensité de la fluorescence retardée, une diminution de la température la fera diminuer.

Dans le domaine de température compris entre -190°C et -150°C (ou l'intensité de la fluorescence retardée varie peu en fonction de la température), les variations de l'intensité de la fluorescence retardée semblent suivre aussitôt les variations de la température. Mais pour les températures plus élevées, on a souvent remarqué un retard, de l'ordre de 5 minutes, des variations de l'intensité de la fluorescence retardée par rapport aux variations de la température.

Pour des températures supérieures à -150°C, on a observé, dans certains cas, qu'après un changement de la température de l'échantillon la variation correspondante de l'intensité de fluorescence retardée ne se produisait progressivement, qu'en présence du rayonnement excitateur. Dans le cas étudié plus loin, où la fluorescence retardée est excitée indirectement par transferts d'énergie d'excitation d'un colorant à l'hydrocarbure, ce dernier phénomène ne se produit pas.

D'autre part, à une température constante donnée, on n'observe pas toujours une constance très grande de l'intensité de fluorescence retardée; on voit souvent des variations lentes se produire sans causes apparentes. Ceci montre que certains facteurs que nous ne contrôlons pas influencent le phénomène, ou que nous ne contrôlons pas suffisamment certains facteurs.

Enfin, il nous est arrivé, une seule fois, de préparer un échantillon qui n'a pas donné de variation de l'intensité de fluorescence retardée, en fonction de la température.

2° - Discussion

Les variations observées en fonction de la température peuvent résulter soit de changements de structure des solvants congelés soit de changements dans les interactions entre le soluté et le solvant soit à des modifications intra ou intermoléculaires produites par les chocs thermiques dans les molécules du soluté.

De toutes façons, l'origine de ces modifications est l'agitation moléculaire. Donc, puisque les phénomènes semblent à peu près réversibles en fonction de la température et que les courbes, obtenues en faisant monter lentement et régulièrement la température, ont toujours à peu près la même allure, on peut essayer de calculer les énergies d'activation thermique correspondant aux diverses courbes obtenues en fonction de la température.

Portons sur un graphique les logarithmes des réponses à 4270 Å (pic de fluorescence retardée) en fonction de l'inverse de la température absolue. Dans le cas du xylène, on peut distinguer deux parties dans les courbes obtenues (figure 23).

a) une partie à peu près rectiligne comprise entre -190°C et -160°C, qui se prolonge par une partie stationnaire ou légèrement décroissante en fonction de T, du côté des températures élevées.

b) vers -150°C, on assiste à une augmentation extrêmement rapide de l'intensité de la fluorescence retardée en fonction de la température. Cette partie de courbe, qui débute par une partie rectiligne, s'incurve progressivement pour devenir décroissante en fonction de T, vers les températures élevées.

Si l'alcool est utilisé comme solvant, on observe une courbe analogue.

On a donc l'impression qu'il existe deux barrières de potentiel correspondant chacune à l'une des deux parties rectilignes des courbes.

Les pentes des parties rectilignes permettent d'estimer la hauteur des deux barrières de potentiel hypothétiques.

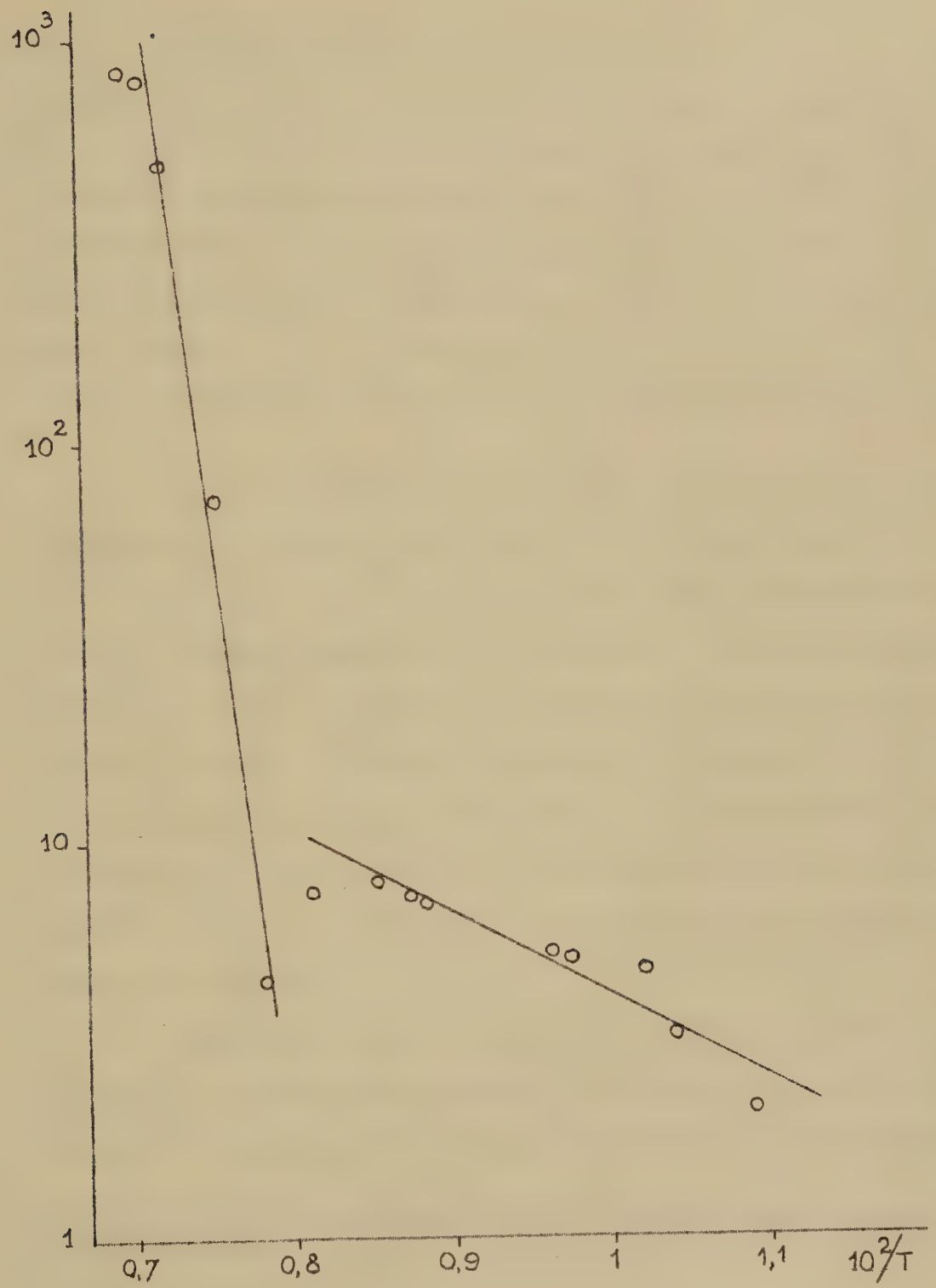


Figure 23

Influence de la température sur l'intensité de la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène (solution à 2150 γ/cm3 dans le xylène).

En ordonnée : hauteur du pic à 4270 A, avec une échelle logarithmique.

Le calcul donne :

	droites de forte pente	droite de faible pente
Dans le xylène	4350 cm^{-1} (moyenne de 5250-3150-4650)	345 cm^{-1}
Dans l'alcool	4750 cm^{-1}	

Donc, aux erreurs près, les hauteurs des barrières de potentiel données par les droites de forte pente sont les mêmes dans les deux solvants. Ceci semble indiquer que les variations dans l'intensité de la fluorescence retardée produites par les changements de température résultent de modifications inter ou intra-moléculaires des molécules dissoutes. Les barrières de potentiel calculées sont peut-être les énergies d'états dans lesquels les molécules devraient être portées par chocs thermiques, pour que la fluorescence retardée soit possible. Les deux barrières de potentiel trouvées pourraient correspondre à deux chemins possibles pour aboutir à l'émission étudiée.

Cependant certains des faits cités dans le paragraphe précédent montrent que ce schéma est probablement trop simplifié. D'autres facteurs, tels que les changements de structure des solvants, doivent intervenir aussi.

G/ - ROLE DES GAZ ATMOSPHERIQUES INCLUS OU DISSOUS DANS L'ECHANTILLON

1° - Expérience

Un échantillon congelé, "exempt" de gaz atmosphériques a été préparé de la façon suivante :

Une solution de 3-4 benzopyrène à 1000 γ par cm3 d'alcool est placée dans une cuve en silice fondue, reliée par une soudure silice-verre à une pompe à vapeur de mercure munie de pièges à azote liquide. On amène la pression gazeuse à moins de 10^{-3} mm. de mercure (voyant à décharge) au dessus de la solution congelée à -190°C, puis on réchauffe la solution à 40°C, après avoir isolé la cuve de la pompe, par un robinet; cette opération est répétée 6 fois, de façon à bien dégazer la solution. La cuve est alors placée dans le phosphoroscope (des raccords avec rodages sphériques permettent la mobilité de la cuve) après congélation de la solution. Le vide est entretenu au dessus de la solution et on vérifie de temps à autre que la pression est inférieure à 10^{-3} mm. de mercure.

L'échantillon sous vide donne, à -190°C, une intensité de fluorescence retardée égale à celle obtenue avec la même solution en présence d'air.

Si on réchauffe progressivement la solution sous vide, on constate d'abord une lente augmentation de l'intensité de fluorescence retardée, puis une augmentation très rapide et un maximum dont la valeur est beaucoup plus élevée que celle obtenue à -140°C avec une solution alcoolique en présence d'air. L'intensité est alors du même ordre de grandeur que celle donnée par une solution dans le xylène, en présence d'air, à -140°C.

Ici nous ne pouvions pas introduire le thermocouple dans la solution, ce qui n'a pas permis de mesurer la température.

2° - Conclusions

Cette expérience montre que les gaz atmosphériques dissous ou inclus dans l'échantillon ne sont probablement pas nécessaires à l'apparition de la fluorescence retardée. Ceci semble éliminer notamment toute explication de la fluorescence retardée faisant intervenir l'oxygène (par exemple : photoxydation suivie de chimio-luminescence due à la décomposition du photoxyde).

Le fait qu'on observe, en réchauffant l'échantillon sous vide, une intensité de fluorescence retardée très supérieure à celle obtenue en

présence d'air, semble montrer qu'il existe pour les solutions alcooliques, un processus compétitif de la fluorescence retardée, dû à la présence des gaz atmosphériques.

H/ - EFFET DES CHANGEMENTS DE L'ECLAIREMENT EXCITATEUR

1° - Technique

Afin d'étudier l'effet des variations de l'éclairement excitateur sur la fluorescence retardée, nous avons utilisé trois grilles réductrices de l'éclairement. La première était formée par du grillage (grille n° 1), les deux autres par des plaques de duralumin percées d'un certain nombre d'ouvertures circulaires régulièrement espacées (grilles n° 2 et 3).

On plaçait les grilles toujours dans la même position, entre la lampe et la lentille de quartz formant l'image de la lampe sur l'échantillon, pour tenir compte du manque d'homogénéité des grilles n° 2 et 3.

On pouvait prévoir, d'après l'espacement et le diamètre des ouvertures, un facteur de réduction de l'ordre de 20% pour la grille n° 2 et de l'ordre de 8% pour la grille n° 3.

Les grilles ont été étalonnées plus précisément en cherchant le rapport de réduction des réponses données par la fluorescence vraie d'une solution alcoolique congelée de 3-4 benzopyrène. Il faut prendre soin de placer les filtres de Wood entre les grilles et la lampe, sinon l'échauffement de ces filtres varie suivant la grille utilisée, ce qui modifie considérablement leur transmission. L'échauffement de l'échantillon par le rayonnement excitateur peut varier aussi suivant la grille utilisée, ce qui pourrait amener des changements dans le rendement de fluorescence de l'échantillon.

Cependant les variations de l'intensité de fluorescence, due à ces changements de température, doit être assez faible. En effet, aussitôt après le remplacement d'une grille, on ne constatait pas de variation lente de la réponse obtenue, le spot se stabilisait aussitôt à une position donnée. Or, dans les études qui suivent sur la fluorescence retardée, dont l'intensité varie fortement avec la température, dans certains domaines de température, la période d'établissement de l'équilibre des températures se manifeste nettement par une variation progressive de la déviation du galvanomètre, qui suit un changement de l'éclairement excitateur.

Si le nombre des molécules de 3-4 benzopyrène, qui se trouve dans l'état triplet au cours de l'excitation, est faible par rapport au nombre des molécules dans l'état fondamental, l'intensité de fluorescence doit être proportionnelle au flux excitateur. En supposant qu'il en est ainsi, on peut calculer les rapports de réduction de flux des différentes grilles.

Les résultats sont vérifiés en mesurant les variations d'intensité de la luminescence $T \rightarrow S$ du 3-4 benzopyrène. Les résultats concordent bien.

Pour contrôler ces données, nous avons mesuré les rapports en remplaçant l'échantillon par une thermopile munie d'une fente de 0,5 mm de large. Les résultats sont un peu différents mais ne s'éloignent pas beaucoup des précédents. Nous avons adopté pour les valeurs des rapports de réduction de l'éclairement, les moyennes des résultats obtenus avec la thermopile et de ceux obtenus avec la fluorescence.

Dans le tableau suivant sont reportées les différentes valeurs obtenues :

	Fluorescence	Phosphorescence T1 So	Thermopile	Valeur prévue d'après les conditions géométriques	Valeur adoptée
Grille n° 1	0,51	0,528	0,442		0,475
Grille n° 2	0,268	0,260	0,230	0,20	0,250
Grille n° 3	0,0805	0,086	0,085	0,08	0,083

Pour faire les mesures avec la fluorescence retardée, on doit tenir compte du fait qu'en éclairant avec différents flux on modifie la température de l'échantillon. Ainsi qu'on l'a signalé, on voit qu'aux températures où l'intensité de fluorescence retardée varie fortement avec la température, la déviation du galvanomètre varie lentement pendant une minute environ dans la période qui suit immédiatement un changement d'éclairement de l'échantillon. Pour corriger autant que possible cette source d'erreur on enregistre pendant une minute, la déviation et

on extrapole les courbes obtenues jusqu'au moment du changement d'éclairement (pendant les 3 secondes nécessaires au galvanomètre pour atteindre l'équilibre).

A -190°C, cette précaution est inutile, puisqu'on ne constate pratiquement pas de changement de la déviation au cours du temps de l'éclairement.

2° - Résultats et discussion

a) Fluorescence retardée de solutions alcooliques en présence d'air :

On excite l'échantillon à -190°C, dans les conditions habituelles.

On obtient les points marqués par des cercles sur le graphique A de la figure 24, en coordonnées doubles logarithmiques. Les points s'alignent presque sur la droite $Y = X^2$, on constate seulement une légère diminution de la pente vers les petits éclairements.

- Première interprétation :

Ce résultat semble montrer que le rendement de la fluorescence retardée croit à peu près proportionnellement à l'éclairement excitateur.

- Deuxième interprétation :

Il a été montré précédemment que le rendement de la fluorescence retardée croit avec la température entre -190°C et -140°C. On pouvait donc se demander si le rendement de fluorescence retardée, à température constante, n'était pas indépendant de l'éclairement excitateur; l'augmentation du rendement que l'on observe lorsque l'éclairement excitateur augmente ne serait dû qu'à l'augmentation de la température, résultant d'un apport plus important d'énergie à l'échantillon par le rayonnement excitateur.

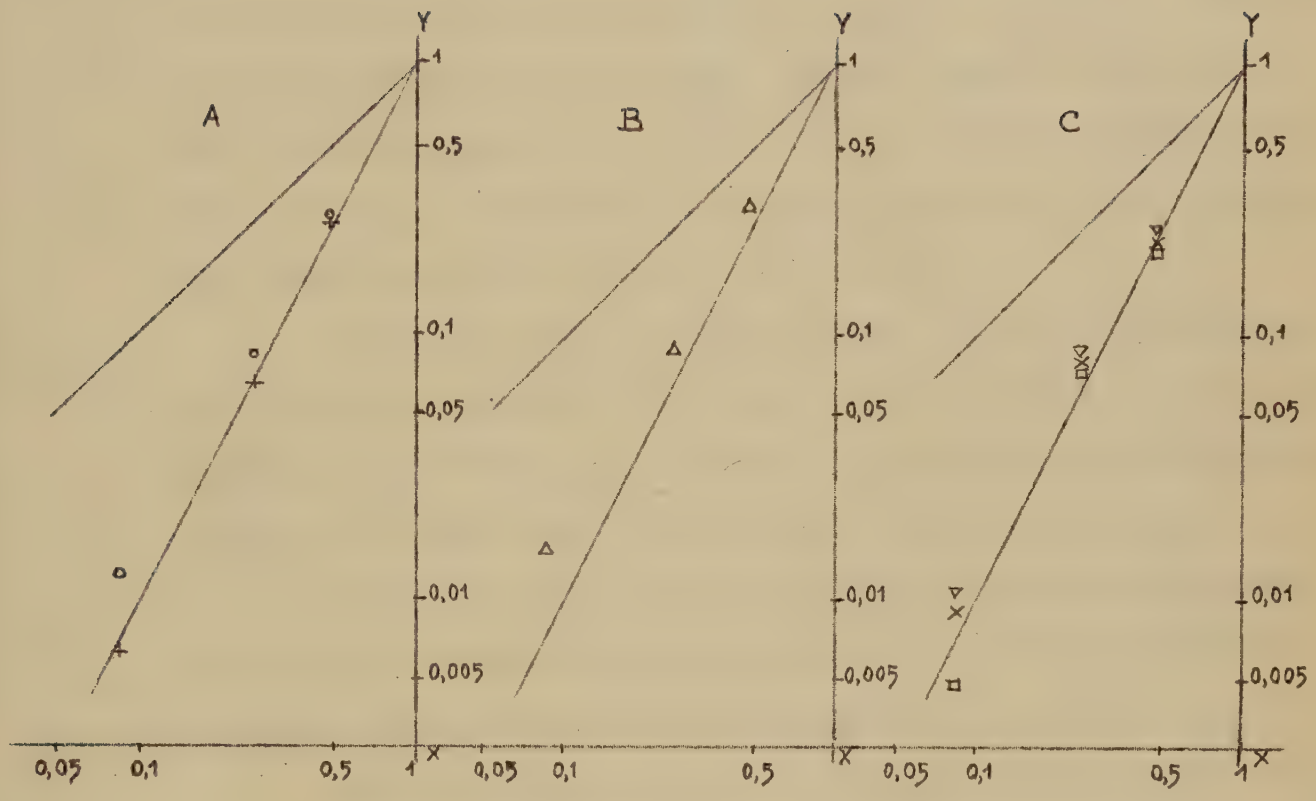


Figure 24

Influence de l'éclairement excitateur sur l'intensité de la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène en solution alcoolique à la concentration de 1300 γ /cm3)

X = rapports de réduction d'éclairement des grilles
Y = rapports de l'intensité de fluorescence retardée à celle obtenue sans grille réductrice d'éclairement.
On a tracé les droites $Y = X$ et $Y = X^2$
Les coordonnées sont logarithmiques.

A : à -190°C o = rayonnement d'excitation filtré par du verre
\+ = rayonnement d'excitation filtré par "ultraviol" + SO_4Cu 5%
B : Δ = température un peu supérieure à -140°C; excitation filtrée par "ultraviol" + SO_4Cu 5%.
C : températures comprises entre -150°C et -120°C ; excitation indirecte par l'intermédiaire du sel de sodium de la fluorescéine ;
∇ = partie décroissante de la courbe de l'intensité de fluorescence retardée en fonction de la température.
$\square$ = partie croissante de cette courbe
$\times$ = partie horizontale de cette courbe

Si la deuxième interprétation était fondée, on devrait observer les phénomènes suivants :

- Plus l'éclairement excitateur serait petit, plus la loi de variation de l'intensité de fluorescence retardée en fonction de l'éclairement excitateur devrait être proche d'une relation de proportionnalité. En effet, l'échauffement de l'échantillon par le rayonnement excitateur étant plus faible, les variations du rendement de fluorescence retardée devraient être moins grandes d'un éclairement à l'autre.

- Dans un domaine de température où le rendement de fluorescence décroit quand la température s'élève, on devrait observer, lorsque l'éclairement excitateur croit, une croissance de l'intensité de la fluorescence retardée moins rapide que ne l'exigerait une loi de proportionnalité.

L'étude de l'effet des variations de l'éclairement excitateur, dans différentes conditions, dont les résultats sont représentés sur la figure 24, montre qu'il n'en n'est pas ainsi.

On peut voir notamment, sur le graphique C de la figure 10, que l'influence des variations de la température de l'échantillon, dues aux changements de l'éclairement d'excitation, se manifeste seulement par de légères déviations des points expérimentaux par rapport à la courbe moyenne qui est très proche de celle correspondant à une proportionnalité de l'intensité de fluorescence retardée au carré de l'éclairement d'excitation.

Il parait difficile d'expliquer cette relation autrement que par l'intervention nécessaire des photons d'excitation par paires, deux photons servant à exciter une molécule dans son état premier singulet. En effet, la probabilité d'atteinte de la cible élémentaire par deux photons pendant un certain intervalle de temps est alors proportionnelle au carré de l'é-

clairement d'excitation. (x)

b) Fluorescence retardée de solutions dans le xylène, en présence d'air.

Ce solvant est un mélange d'ortho-, de méta-, et de para-xylène, il ne se congèle pas sous la forme de verre, et de plus il est légèrement absorbant dans la région 3000-4000 Å. On pouvait donc s'attendre avec ce solvant à des phénomènes plus complexes et moins reproductibles qu'avec l'alcool. En effet, les résultats sont ici beaucoup moins clairs.

L'influence de l'éclairement excitateur a été étudiée à des températures voisines de celle donnant le maximum d'intensité de fluorescence retardée, c'est-à-dire vers -140°C. D'une expérience à l'autre les courbes diffèrent notablement. Leur concavité est toujours tournée vers le bas. Aux petits éclairements, la pente est presque parallèle à la droite $y = x^2$ et vers les grands éclairements la pente devient très proche de celle de la droite $y = x$. Sur la figure 25, une de ces courbes est représentée.

L'interprétation proposée pour expliquer les résultats obtenus avec l'alcool peut être conservée ici, à condition de supposer, par exemple, qu'il existe une saturation des centres susceptibles de donner lieu à la fluorescence retardée, ce qui aurait tendance à diminuer la pente des courbes aux forts éclairements.

Cette explication est suggérée par le fait que l'intensité de fluorescence retardée dans le xylène est beaucoup plus grande que celle obtenue dans l'alcool, en présence d'air, vers -140°C.

c) Fluorescence retardée d'une solution alcoolique dégazée.

Une solution alcoolique à 1000 γ /cm3, dégazée comme il est indiqué au paragraphe G, est portée à la température qui donne l'intensité

(x) Nous rappelons que PARKER et HATCHARD (64) ont trouvé la même relation dans le cas de solutions d'anthracène, à la température ordinaire.

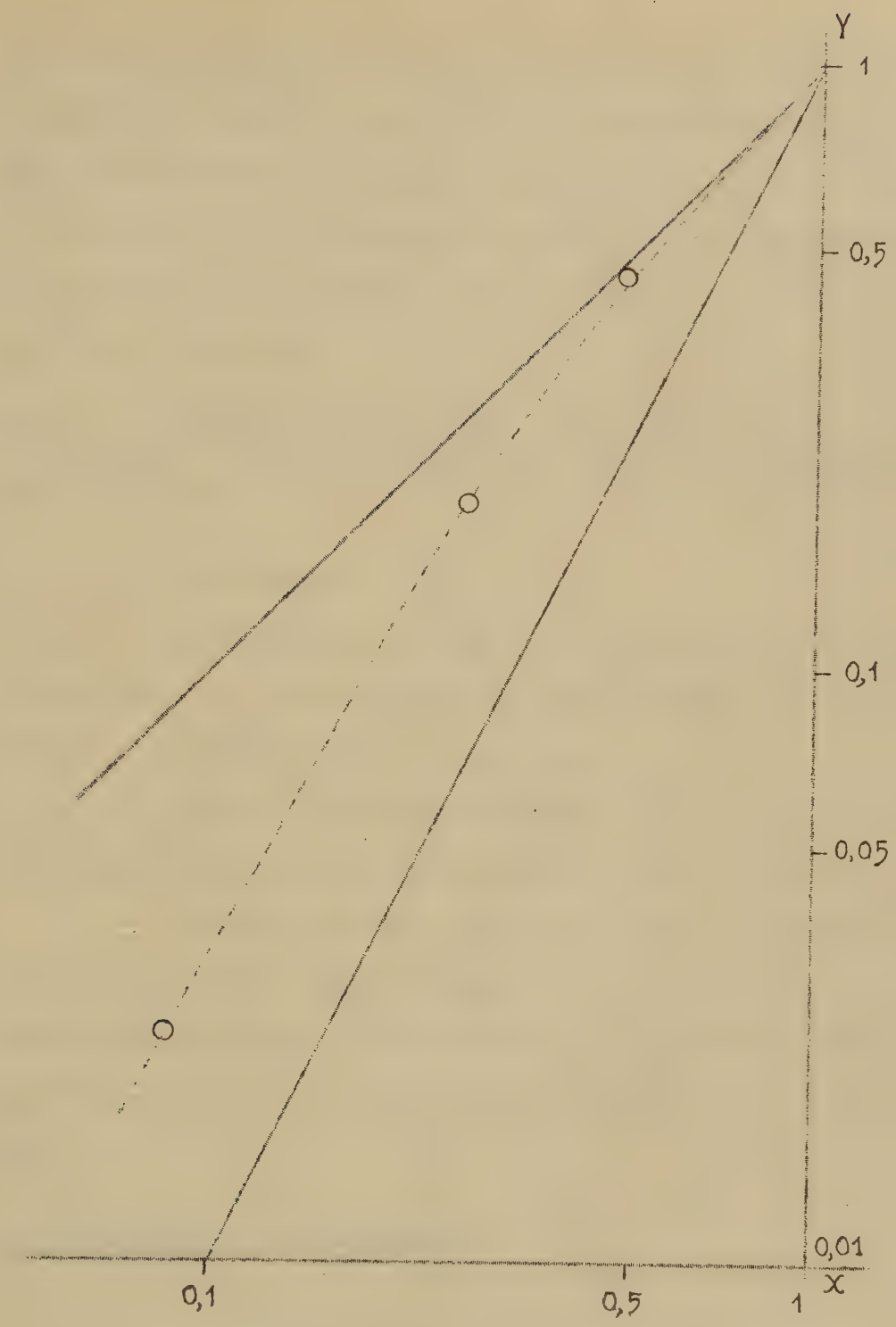


Figure 25

Influence de l'éclairement excitateur sur la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène en solution dans le xylène (concentration 1300 γ/cm3, température voisine de -140°C).

X = rapport de réduction d'éclairement des grilles
Y = réduction de l'intensité de fluorescence retardée par rapport à celle obtenue sans grilles réductrices d'éclairement.
Coordonnées doubles logarithmiques
On a tracé les droites $Y = X$ et $Y = X^2$

de fluorescence retardée maximale. La courbe représentant l'intensité de fluorescence retardée en fonction de l'éclairement excitateur se situe, dans ces conditions, comme dans le cas du xylène à -140°C, entre les droites $Y = X$ et $Y = X^2$. L'explication proposée pour les solutions dans le xylène pourrait être conservée puisque l'intensité de fluorescence retardée est aussi très élevée.

Cependant, ici, la courbe ne semble pas avoir sa concavité tournée vers le bas; elle se rapproche d'une droite; toutefois, les mesures n'ont pas été faites, dans ce cas, avec une précision suffisante pour pouvoir l'affirmer.

d) Luminescence $T \rightarrow S$

L'influence de l'éclairement excitateur sur l'intensité de luminescence $T \rightarrow S$ d'une solution de 3-4 benzopyrène dans le xylène à -140°C a été étudiée dans deux expériences :

Dans la première (concentration 1300 γ par cm3) on obtenait exactement la proportionnalité de l'intensité à l'éclairement.

Dans la deuxième (concentration 2200 γ par cm3) la proportionnalité de l'intensité à l'éclairement était conservée par les faibles éclairements, mais aux forts éclairements l'intensité de luminescence croissait un peu moins vite que ne l'aurait exigé une relation de proportionnalité.

I./ - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION

1° - Technique et résultats

Comme nous avions remarqué que la fluorescence retardée apparaissait mieux pour les solutions très concentrées en 3-4 benzopyrène que pour les solutions plus diluées, l'influence de la concentration sur l'intensité de la fluorescence retardée méritait d'être étudiée d'une façon systématique.

Cependant, cette étude ne pouvait être faite d'une façon très précise, à cause du manque de reproductibilité de l'intensité de fluorescence retardée, d'un échantillon congelé à l'autre.

Néanmoins, à condition de congeler toujours les solutions de la même façon, les résultats (figure 26) ne sont pas incohérents, et on voit nettement que la fluorescence retardée (hauteur du pic à 4270 Å), croit, à peu près, proportionnellement à la concentration, entre 100 γ et 1300 γ par cm3, alors que la luminescence $T_1 \rightarrow S_0$ reste pratiquement constante.

2° - Discussion

a) Courbe obtenue avec la phosphorescence $T \rightarrow S$ (figure 26) :

Aux concentrations comprises entre 100 γ et 1300 γ par cm3, le rayonnement excitateur est absorbé dans une couche très mince de l'échantillon. Nous allons montrer que, dans ces conditions, il est normal que la réponse de l'appareil à la luminescence T _ S ne varie pas avec la concentration.

Evaluons le flux F de la phosphorescence T _ S atteignant la surface sensible du photomultiplicateur; soient (figure 27) :

- So le plan de la surface de l'échantillon,
- Mo un point de cette surface vue par la photocathode,
- MoX l'axe optique du miroir collimateur du monochromateur, correspondant à la fente d'entrée, orienté vers l'intérieur de l'échantillon.

Scient M, M', M1 des points de cet axe tels que :

$$\overline{MoM} = x \qquad \overline{MM'} = dx \qquad \overline{MoM1} = a - \frac{b}{2} = a'$$

a étant la largeur du faisceau d'excitation
b étant la largeur de l'image de la fente d'entrée du monochromateur dans la lentille d'observation.
x, dx étant des nombres positifs et dx un infiniment petit par rapport à x.

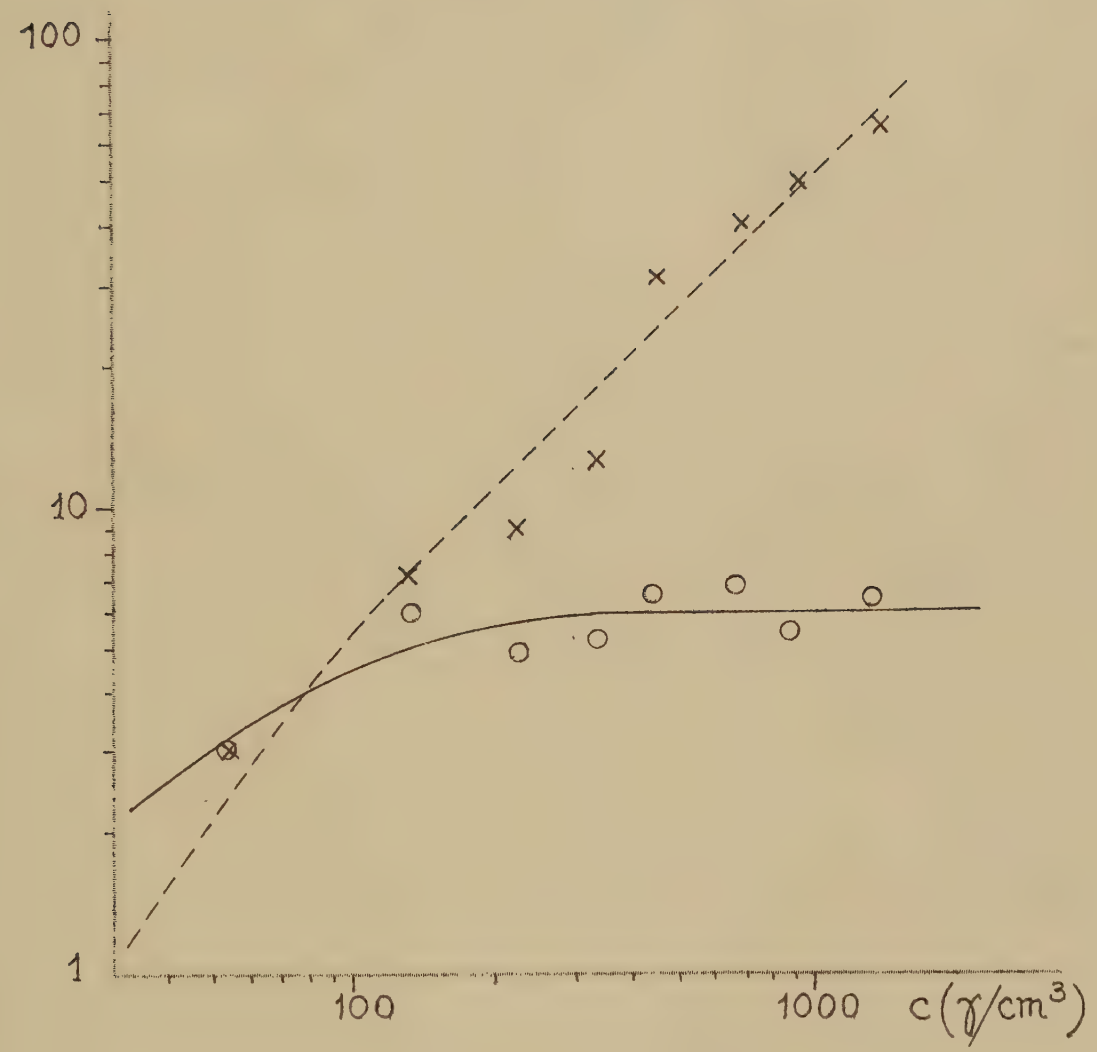


Figure 26

Influence de la concentration sur l'intensité de fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène, en solution dans l'alcool.

Coordonnées doubles logarithmiques.

o = luminescence $T \longrightarrow S$: hauteur du pic à 6815 A
x = fluorescence retardée : hauteur du pic à 4270 A

——— : $F = 62\ (1-e^{-1,4\ c/100})$

——— : $F' = 0,58\ c\ (1-e^{-2,8\ c/100})$

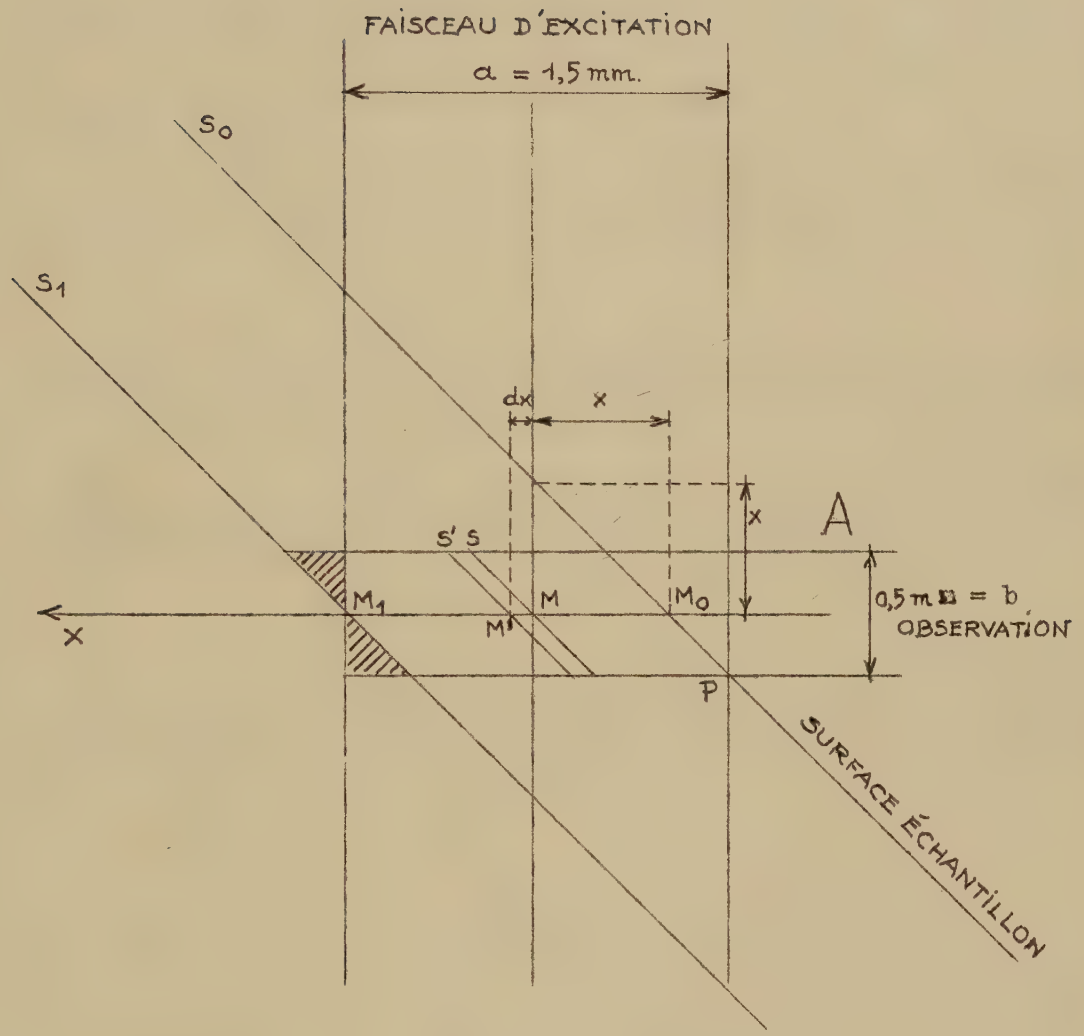


Figure 27

Schéma représentant la disposition relative de l'échantillon, du faisceau d'excitation et du faisceau d'observation, pour le calcul des réponses du photomultiplicateur en fonction de la concentration de la solution congelée.

(Projection sur le plan contenant l'axe du faisceau d'excitation et l'axe du faisceau d'observation).

Soient S, S', S1 les plans parallèles à So et passant respectivement par M, M', M1.

Le volume de l'échantillon, vu de l'appareil, est limité approximativement par un cylindre A d'axe MoX.

Ce cylindre découpe sur la surface So de l'échantillon une région de surface s.

Si l'éclairement par le rayonnement excitateur est Eo sur la surface So, l'éclairement E sur la surface S est :

$$E = Eo.\ e^{-k\ x\ c}$$

c, étant la concentration de la solution
k, étant, au facteur M près, la constante d'extinction spécifique du 3-4 benzopyrène dans l'alcool à -190°C.

Si le rendement de luminescence T $\rightarrow$ S du 3-4 benzopyrène est R, le flux df du rayonnement émis par la couche infiniment mince de l'échantillon comprise entre S et S' et limitée par le cylindre A est :

$$df = s\ R\ Eo\ e^{-k\ x\ c}\ kc\ dx$$

Si la même fraction m du flux des rayonnements émis par les différentes régions de la partie de l'échantillon vue du photomultiplicateur atteignent la surface sensible de celui-ci, le flux utile F émis par l'échantillon est approximativement :

$$F = m.\ s.\ R.\ Eo. \int_0^{a'} k.\ c.\ e^{-k.c.x.}\ .\ dx$$

$$= m.\ s.\ R.\ Eo\ \left(1 - e^{-k.a'.c}\right) = m.s.R.Eo \left(\frac{I_o - I}{I_o}\right)_{a'};$$

étant donné qu'on peut considérer que les deux surfaces hachurées sur la figure 27 sont égales et que leur éclairement moyen serait le même si le faisceau excitateur était plus large,

$\left(\frac{I_o - I}{I_o}\right)_{a'}$ étant le facteur d'absorption de la solution sous l'épaisseur a'.

Finalement, on voit que F tend vers un maximum lorsque la concentration augmente, et que le rapport de F au maximum est égal au facteur d'absorption de la solution sous l'épaisseur a'.

Numériquement, a étant égal à environ 1,5 mm et b à 0,5 mm, on trouve qu'à 50 γ par cm3, F devrait être réduit à 73% de la valeur maximale (en prenant pour facteur d'absorption celui mesuré à la température or-

dinaire à 3650 A).

Expérimentalement, on trouve 50%. La différence est probablement dûe aux erreurs expérimentales et aux approximations faites pour le calcul.

Sur le graphique de la figure 26 a été dessinée la courbe représentative de la fonction

$$F = A.\ (1 - e^{-B.c}) .$$

en calculant les coefficients A et B de façon à ce qu'elle représente au mieux les résultats expérimentaux obtenus avec la luminescence T → S.

b) Courbe obtenue avec la fluorescence retardée :

Pour expliquer que l'intensité de fluorescence retardée croit à peu près proportionnellement à la concentration, à des concentrations supérieures à 100 γ par cm3, il faut supposer que le rendement de la fluorescence retardée n'est pas indépendant de la concentration, et qu'il croît proportionnellement à celle-ci.

Evaluons dans ces conditions, F', le flux de fluorescence retardée atteignant la surface sensible du photo-multiplicateur :

Nous avons montré que l'intensité de fluorescence retardée, à concentration constante, croit comme le carré de l'éclairement excitateur, pour le 3-4 benzopyrène dans l'alcool à -190°C à la concentration de 1300 γ par cm3. Supposons qu'il en soit ainsi quelle que soit la concentration. Le rendement R est alors de la forme :

$$R = Ro.\ c.\ E$$

Donc, on a avec les mêmes notations que précédemment :

$$F' = m.\ s.\ Ro.\ Eo^2.\ c. \int_0^{a'} k.\ c.\ e^{-2k.c.x}\ .\ dx$$

$$= \frac{m.s.Ro.\ Eo^2.\ c}{2} \left[1 - e^{-2k.a'.c} \right]$$

Donc, F' est de la forme, en fonction de c :

$$F' = D.\ c.\ (1 - e^{-2B.c.})$$

Nous ajustons D, en gardant pour B la même valeur que précédemment, pour que la courbe représentative de cette fonction coïncide le mieux possible avec les résultats expérimentaux. On voit que la variation obtenue expérimentalement est convenablement représentée par cette fonction.

3° - Conclusions

Donc, il semble qu'on puisse admettre que le rendement de fluorescence retardée varie proportionnellement à la concentration en 3-4 benzopyrène.

Ceci paraît indiquer qu'une interaction entre les molécules dissoutes, intervient dans le phénomène. Cette interaction serait d'autant plus probable que la concentration est plus grande.

Finalement la dépendance de R proportionnellement à c et à E montre que le rendement de fluorescence retardée dans ces expériences est proportionnel au nombre de photons absorbés par unité de volume (et par unité de temps).

J/ - EFFET DU CHANGEMENT DE LA LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION

Si cette dernière conclusion est générale, on devrait observer une variation du rendement de fluorescence retardée, en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

En effet, à éclairements égaux, les rayonnements les plus fortement absorbés par la solution donnent un plus grand nombre de photons par unité de volume et par unité de temps, dans la couche superficielle de

l'échantillon, que les rayonnements moins absorbés par la solution.

1° - Technique

Pour comparer les rendements de luminescence à deux longueurs d'ondes d'excitation différentes, la difficulté est de délivrer à l'échantillon des éclairements égaux de différentes longueurs d'ondes ; d'autre part il faut s'assurer que les rayonnements d'excitation sont absorbés dans une couche suffisamment mince de l'échantillon pour que toute l'épaisseur de solution fortement luminescente soit vue par le photomultiplicateur et qu'on puisse admettre que les rapports des intensités mesurées soient égaux aux rapports des rendements.

Les deux longueurs d'ondes d'excitation 3130 A et 3650 A ont été utilisées pour ces comparaisons.

Elles étaient isolées par les filtres suivants :
a) "Ultraviol" (filtre de Wood) qui, utilisé avec la lampe à vapeur de mercure haute pression S.P. 500, donne un rayonnement dont 90% du flux est sous la forme de longueurs d'ondes voisines de 3650 A.

b) La succession des filtres suivants :
"Renovic" de"Sovirel", "Corning n° 9863" et 2 cm d'une solution de sulfate de Nickel saturée.

Le rayonnement de la lampe S.P. 500, filtré par ce système de filtres, donne un rayonnement dont la répartition spectrale des flux est la suivante (sans tenir compte du rouge et de l'infrarouge) :
3130 A : 66% - 3341 A : 33,5% - 3650 A : 0,5 %.

L'absorption de la solution congelée, à "3130 A" et à "3650 A" est suffisante pour que 90% du flux excitateur soient absorbés dans moins de 1 mm d'épaisseur, ainsi que le montre l'observation citée plus loin. On peut donc admettre qu'à éclairements égaux, les réponses de l'appareil à la fluorescence retardée sont proportionnelles aux rendements.

L'intensité de phosphorescence $T \rightarrow S$ est environ 5 fois plus faible avec l'excitation "3130 A" qu'avec l'excitation "3650 A". Pour ramener les éclairements excitateurs à égalité, nous avons supposé que le rende-

ment de la phosphorescence $T \rightarrow S$ est indépendant de la longueur d'onde d'excitation. Nous avons simplement égalisé, le mieux possible, les réponses de l'appareil à la phosphorescence $T \rightarrow S$ (à 6815 A), en ajustant la largeur d'une fente réglable interposée entre la lampe et la lentille d'excitation (le plus près possible de cette lentille).

Le rapport entre la hauteur du pic de phosphorescence $T \rightarrow S$ et du pic de fluorescence retardée à alors été mesuré, dans ces conditions, avec les deux longueurs d'ondes d'excitation.

2° - Résultats

On a trouvé les résultats suivants :

Excitation à "3130 A" : $\dfrac{\text{Fluorescence retardée}}{\text{Phosphorescence } T \rightarrow S} = 0{,}29$

Excitation à "3650 A" : " $= 0{,}35$

(Solution alcoolique à 1300 γ/cm3, température -190°C)

3° - Discussion

En supposant que la densité optique est proportionnelle à la concentration et qu'elle change peu à la congélation, on peut voir (d'après le spectre d'absorption d'une solution à 500 γ/cm3, à la température ordinaire), que la même proportion de l'énergie d'excitation est absorbée, à 3650 A, dans une épaisseur de solution 7 fois plus petite qu'à 3130 A et 5 fois plus petite qu'à 3341 A.

Donc, si les conclusions du paragraphe E sont générales, on devrait observer un rendement de fluorescence retardée de 5 à 7 fois plus grand avec l'excitation à "3650 A" qu'avec l'excitation à "3130 A".

Mais il est possible qu'on ne puisse pas prévoir l'absorption de la solution congelée à 1300 T /cm3, à partir de celle de la solution à 500 T /cm3, à la température du laboratoire.

Ceci, ainsi que le manque de précision de la comparaison des rendements de fluorescence retardée aux différentes longueurs d'ondes, pourrait expliquer qu'on n'ait pas mesuré une différence plus grande entre les rendements de la fluorescence retardée excitée à "3650 A" et à "3130 A".

K/ - ENREGISTREMENT DES COURBES DE DECROISSANCE DE LA FLUORESCENCE RETARDEE ET DE LA LUMINESCENCE T ⟶ S ET COMPARAISON DE LA DUREE DE VIE DES DEUX PHENOMENES.

1° - Résultats

Les courbes de décroissance de la fluorescence retardée et de la luminescence T ⟶ S, après l'arrêt de l'excitation, ont été déterminées approximativement par la méthode décrite au paragraphe E n° 2 du chapitre II.

Pour des solutions à 1300 /cm3 dans l'alcool, on a trouvé, à -190°C, pour les deux phénomènes, des courbes qui semblent exponentielles (bien que la précision soit insuffisante pour pouvoir l'affirmer) (figure 28).

A -140°C, la courbe ne pouvait être tracée, en raison de la difficulté d'obtenir une température bien constante de l'échantillon pendant toute la durée de l'expérience, ce qui occasionne des changements dans le rendement de la fluorescence retardée au cours des mesures. Ici, nous avons seulement mesuré les rapports entre les déviations obtenues pour le décalage minimum et le décalage maximum, avec diverses vitesses de rotation des disques du phosphoroscope, et pour chaque vitesse nous en avons déduit, en

supposant la décroissance exponentielle, le coefficient τ (inverse de la valeur absolue du coefficient du temps de l'exponentielle). On fait ensuite la moyenne des résultats obtenus.

Les constantes de temps τ, déterminées à -190°C et -140°C sont portées dans le tableau suivant, ainsi que les rapports τ (T → S)/ τ (F.R.) de la constante de temps relative à la luminescence T S à celle relative à la fluorescence retardée :

Température	τ → Luminescence T → S	τ (F.R.) Fluorescence retardée	$\frac{\tau\,(T \rightarrow S)}{\tau(F.\,R.)}$
- 190°C	0,18 s	0,10 s	1,8
- 140°C	0,095 s	0,034 s	2,8

Les erreurs sur les mesures de τ peuvent être de l'ordre de ± 10% à 190°C et de l'ordre de ± 20% à -140°C (en raison d'une plus grande instabilité de la température et d'une variation plus rapide de l'intensité de fluorescence retardée avec la température à -140°C).

Cependant, aux deux températures, on peut affirmer que la constante de temps de la décroissance de la fluorescence retardée est plus petite que celle de la luminescence T → S.

On peut d'ailleurs le vérifier aisément en faisant varier la vitesse de rotation du phosphoroscope. Le décalage des disques restant fixe.

Par exemple, à -190°C, avec une solution de 3-4 benzopyrène à 1000 γ par cm3 dans l'alcool et une cadence de 25 interruptions par seconde, on obtient à 6815 A un pic de luminescence T S de 70 divisions et à 4270 A un pic de fluorescence retardée de 10 divisions. Avec une cadence de 1,6 interruptions par seconde et en modifiant la tension du photomultiplicateur de façon à avoir encore un pic de 70 divisions à 6815 A, on n'obtient plus qu'un pic de fluorescence retardée à 4270 A de 1,9 division.

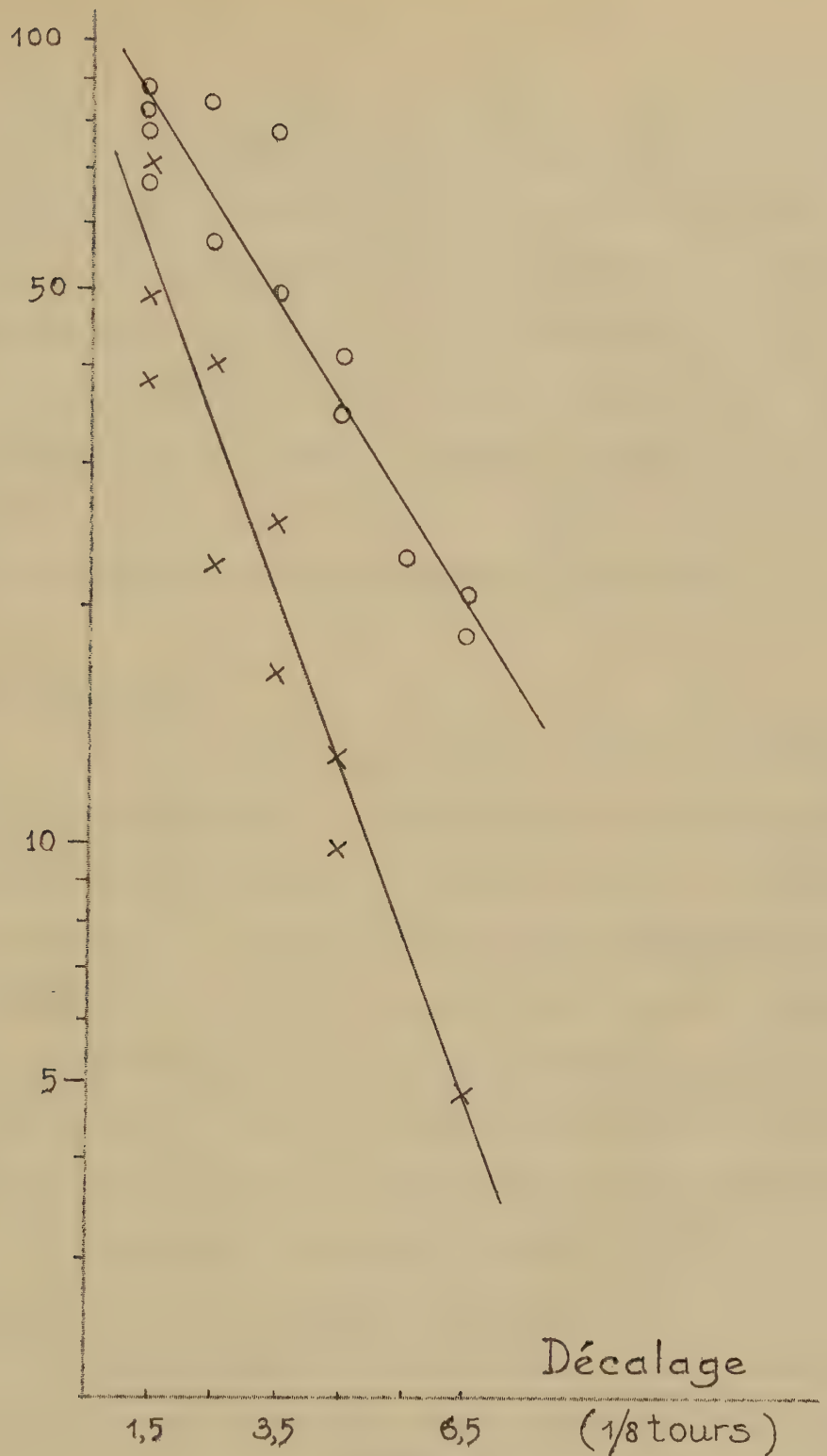


Figure 28

Courbes de décroissance de la luminescence $T_1 \rightarrow S_0$: (o) et de la fluorescence retardée: (x).

En ordonnée : déviations du galvanomètre, en échelle logarithmique, à 6815 A pour la luminescence $T_1 \rightarrow S_0$ et à 4270 A pour la fluorescence retardée.

Donc la diminution de la cadence d'interruption provoque une diminution bien plus grande de la fluorescence retardée que de la luminescence $T \rightarrow S$, ce qui montre que la décroissance de la fluorescence retardée est plus rapide que celle de la luminescence $T \rightarrow S$.

Il convient de signaler ici, la fluorescence retardée signalée récemment pour les solutions hexaniques congelées de pérylène (66). La durée de vie du phénomène serait de l'ordre de 10 secondes. Dans ce cas, la durée de vie de l'état triplet n'est pas connue.

2° - Discussion

a) On peut remarquer, dès maintenant, que l'observation d'un temps de décroissance de la fluorescence retardée plus court que celui relatif à la luminescence $T \rightarrow S$ paraît éliminer le mécanisme de la phosphorescence α admis pour les solutions solides de colorants (35) (passage de l'état premier triplet à l'état premier singulet, par l'effet des chocs thermiques, avec passage intermédiaire par des niveaux vibrationnels excités de l'état T1). Ce mécanisme semblait, d'ailleurs, déjà très improbable en raison de la séparation très grande des niveaux 1S et 1T.

En effet, ce processus ne pourrait conduire à une durée de vie plus courte que celle de la luminescence $T \rightarrow S$:

- Si les durées de vie des états intermédiaires étaient plus courtes que la durée de vie du premier triplet, on devrait observer une durée de vie de la fluorescence retardée égale à celle du premier triplet.

Ceci résulte de ce que le nombre de molécules de 3-4 benzopyrène portées dans ces états d'énergie supérieure, par unité de temps, et don-

nant lieu à de la fluorescence retardée, serait alors proportionnel, à tout instant, au nombre de molécules de 3-4 benzopyrène dans leur état premier triplet.

- Si les durées de vie des états intermédiaires étaient plus longues ou égales à celle de l'état premier triplet du 3-4 benzopyrène, on ne pourrait observer qu'un allongement du temps de décroissance de la fluorescence retardée par rapport à celui de la luminescence $T \rightarrow S$.

b) Remarquons que le rapport entre la constante de temps de la luminescence $T \rightarrow S$ et celle de la fluorescence retardée n'est pas différent de 2, aux erreurs expérimentales près, à -190°C.

Le même rapport, à -140°C, n'est peut-être pas non plus différent de 2, bien que dans ce dernier cas, les 5 mesures effectuées ont donné un rapport supérieur à 2.

Ces remarques seront utiles pour la discussion générale des résultats.

L/ - EFFET DE LA LUMIERE VISIBLE SUR LA FLUORESCENCE RETARDÉE EXCITEE PAR L'ULTRAVIOLET

Cette expérience a été faite pour chercher si un mécanisme faisant intervenir nécessairement l'absorption successive de deux photons sur la même molécule de 3-4 benzopyrène, pour la porter successivement dans l'état premier triplet puis dans l'état triplet supérieur Tn révélé par l'absorption dans le visible $T_1 \rightarrow T_n$ (39), était possible. Ce mécanisme semblait, d'ailleurs, déjà peu probable puisqu'il ne nécessite pas d'interaction entre les molécules dissoutes.

Si l'absorption $T_1 \rightarrow T_n$ était l'une des étapes du mécanisme de la fluorescence retardée, on devrait observer le phénomène suivant : un échantillon excité par un rayonnement ultraviolet procurant un faible éclairement, devrait donner une soudaine augmentation de sa fluorescence retardée, lorsqu'il serait fortement éclairé, en plus, par de la lumière visible. L'expérience suivante montre qu'il n'en est pas ainsi.

1° - Technique

Nous avons réalisé le montage suivant schématisé sur la figure 29 :

On utilise deux lampes S.P. 500 ; l'une est placée dans la position habituelle, brûleur S1 vertical; l'autre est disposée avec le brûleur S2 horizontal. On forme une image de S2 en S'2 (pour des raisons d'encombrement), avec une lentille L2, de façon à ce que la distance de S'2 au centre M d'un miroir semi-réfléchissant, placé à 45° de l'axe de la lentille L2, soit égale à la distance de S1 à M. Le miroir est placé de façon à ce que l'image de S'2 après réflexion sur le miroir et passage dans la lentille L1 se forme sur l'échantillon au même emplacement que l'image de S1 après traversée du miroir et de la lentille L1.

Le rayonnement de S1 est filtré par 2 cm d'une solution de nitrite de sodium à la concentration de 0,75 g par cm3. Cette solution est protégée du rayonnement ultraviolet par un filtre "Dicroyal" de Sovirel. La combinaison de ces deux filtres transmet les longueurs d'ondes supérieures à 4100 A et élimine la majeure partie de l'énergie transportée à des longueurs d'ondes inférieures à 4100 A. Le flux de la lampe S1 arrivant sur l'échantillon n'est donc pratiquement pas absorbé par le 3-4 benzopyrène dans l'état fondamental.

L'échantillon est porté à une température un peu inférieure à -140°C, pour obtenir un rendement de fluorescence retardée important, de façon à pouvoir l'observer avec l'éclairement excitateur ultraviolet relativement faible, délivré par la lampe S2.

2° - Résultats

On éclaire d'abord l'échantillon par du visible seul. On n'observe pas de luminescence $T \rightarrow S$ ni de fluorescence retardée, mais un fond continu

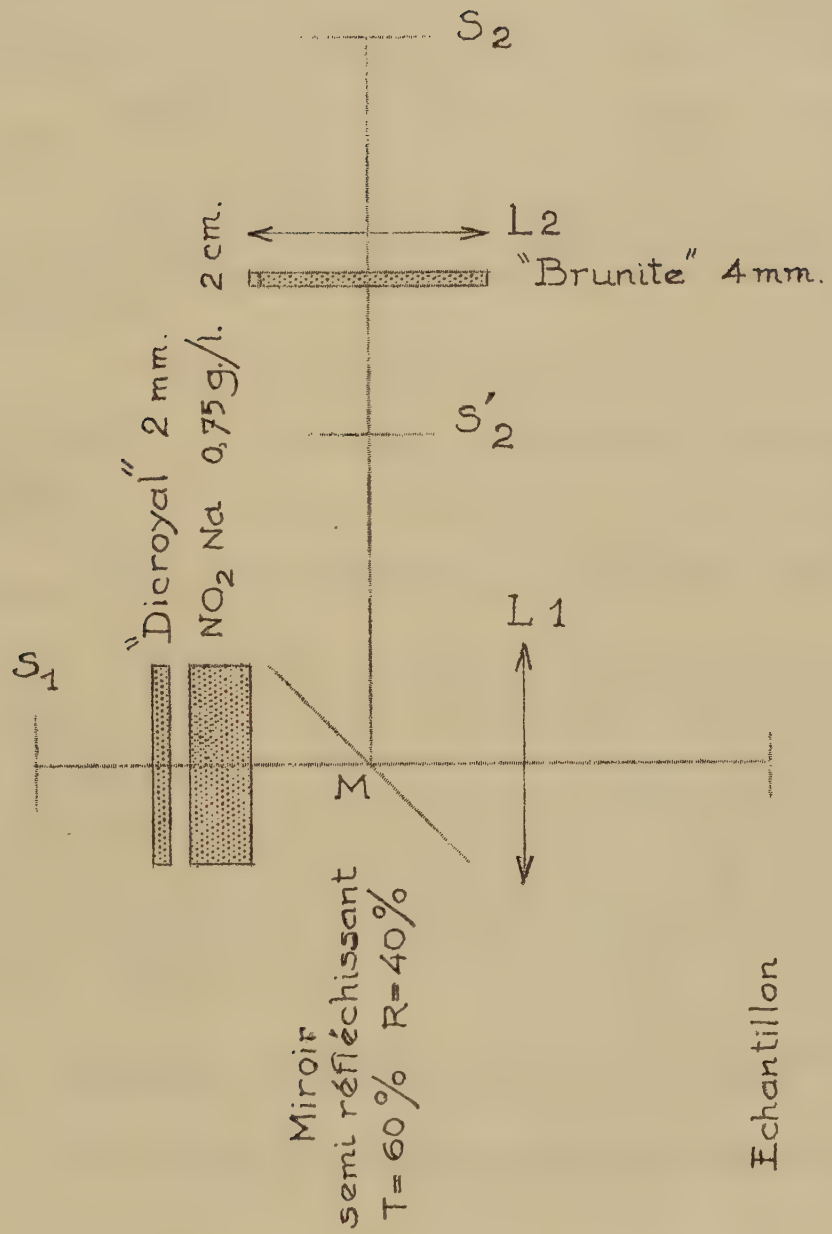


Figure 29

Schéma du montage utilisé pour l'étude de l'influence de la lumière visible sur la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène excité par de l'ultraviolet.

assez intense entre 5000 A et 7000A (vraisemblablement dû aux impuretés)

On éclaire ensuite avec de l'ultraviolet seul. On observe cette fois-ci la luminescence $T \rightarrow S$, la fluorescence retardée et un fond continu entre 5000 A et 7000 A, plus faible que précédemment.

Dans le premier cas, on fait le réglage de la position de l'échantillon, de façon à obtenir le maximum de réponse du photomultiplicateur.

Dans le deuxième cas, on ajuste seulement la position de la lampe S2, sans modifier la position de l'échantillon. On est sûr, de cette façon, que les images des deux lampes se forment dans la même région de l'échantillon.

Lorsque, sans toucher aux réglages, on éclaire simultanément par l'ultraviolet et le visible, la fluorescence retardée de 3-4 benzopyrène n'est pas plus intense que lorsque l'on éclaire par l'ultraviolet seul.

Dans cette expérience, le thermocouple indiquait la même température pendant les trois enregistrements.

Dans une autre expérience où l'on observait seulement la réponse à 4270 A (maximum de fluorescence retardée) en laissant fonctionner en permanence la lampe S2 et où on allumait la lampe S1 seulement pendant certaines périodes, on ne constatait aucune augmentation de la réponse, suivant immédiatement l'allumage de S1 (dans les deux secondes qui suivent l'allumage). Cependant, on observait un lent accroissement de cette réponse, (dans les deux minutes qui suivent l'allumage de S1). Comme cet accroissement lent s'accompagnait d'une augmentation de la température indiquée par le thermocouple, nous l'avons interprété comme un accroissement du rendement de la fluorescence retardée dû à un réchauffement de l'échantillon par le rayonnement visible de la lampe S1.

M/ - EXCITATION INDIRECTE DE LA FLUORESCENCE RETARDEE PAR UN RAYONNEMENT VISIBLE, TRES PEU ABSORBE PAR LES MOLECULES DE 3-4 BENZOPYRENE

Nous avons tenté de démontrer, par ces expériences, que l'excitation de l'état premier triplet est suffisante pour qu'apparaisse la fluorescence retardée (64). Pour cela, il fallait porter le 3-4 benzopyrène dans l'état premier triplet, sans le porter directement dans son

état premier singulet. Or, d'après les travaux de TERENIN (67), ceci devait être possible.

En effet, cet auteur a montré qu'il se produit dans des solutions congelées de mélanges de certaines substances des transferts d'énergie d'excitation d'une des substances portée dans son état premier triplet, à l'autre substance dans son état fondamental, ce qui porte cette dernière dans son état premier triplet. Pour que le transfert soit possible il faut que la hauteur du premier triplet de la substance donneuse d'énergie soit supérieure ou au moins égale à la hauteur du premier triplet de la substance acceptrice d'énergie. Nous avons donc un moyen d'exciter le 3-4 benzopyrène dans son état premier triplet sans l'exciter directement dans son état premier singulet, si nous trouvons des substances ayant un triplet plus haut que celui du 3-4 benzopyrène et un singulet plus bas que celui du 3-4 benzopyrène. Or l'énergie du premier triplet de la plupart des colorants n'est que de 4000 à 5000 cm-1 en dessous de celle de leur premier singulet excité, alors que pour le 3-4 benzopyrène la distance entre ces deux niveaux est de 10.144 cm-1.

Il suffit donc théoriquement d'éclairer une solution d'un mélange de 3-4 benzopyrène et d'un colorant convenablement choisi, par de la lumière absorbée par le colorant mais non par le 3-4 benzopyrène pour exciter ce dernier dans son état premier triplet. Ceci doit conduire à l'apparition de sa fluorescence retardée, si l'excitation du premier triplet du 3-4 benzopyrène est suffisante. Nous avons donc essayé systématiquement un certain nombre de colorants, choisis parmi les plus luminescents, puisqu'une forte luminescence indique que les états excités résistent bien aux influences désactivantes du milieu ce qui augmente la probabilité de

l'occurence des transferts d'énergie d'excitation. Un certain nombre d'entre eux étaient choisis de façon à ce que leur premier triplet soit plus haut que celui du 3-4 benzopyrène, et leur état premier singulet excité plus bas que celui du 3-4 benzopyrène.

1° - Technique

La solution du mélange était excitée, soit au travers de 2 cm d'une solution de nitrite de sodium à 0,75 g par cm3 protégée du rayonnement ultraviolet court par 2 mm de "dicroyal" de"Sovirel" (filtre "nitrite"), soit par une épaisseur de 3 ou 5 cm d'une solution presque saturée de chromate de potassium protégée par un filtre "Katathermic" de Sovirel (filtres "chromate 3 cm" et "chromate 5 cm").

Dans ces conditions on ne constatait aucune photolyse des filtres liquides, même après des irradiations prolongées. Le filtre "Katathermic" avait sa transmission inchangée après une longue période d'irradiation. Le filtre "dicroyal" subissait une photolyse relativement rapide qui se traduisait par une baisse de sa transmission dans le visible et l'ultraviolet, ce filtre devait donc être remplacé de temps en temps et nous devions tenir compte de cette baisse progressive de la transmission pour l'interprétation des résultats des expériences.

Les transmissions de ces trois systèmes de filtres sont indiquées dans le tableau suivant :

Longueurs d'ondes (A)	"Dicroyal" + 2 cm NO_2Na 0,75 g/cm3	Katathermic		T2/T5
		+ 2 cm CrO_4K_2 (T2)	+ 5 cm CrO_4K_2 (T5)	
2300-3700	$< 10^{-4}$	$< 10^{-100}$	$< 10^{-100}$	
3700-4100	< 2%			
4100-4500				
(4360)	70%			
4500-4900		$< 10^{-6}$	$< 10^{-15}$	
(5000)		0,3%	10^{-6}	300
(5100)		12%	1%	12
(5200)		35%	12%	2,9
(5300)		56%	36%	1,5
(5460)		67%	56%	1,2
abréviations	"Nitrite"	"Chromate 2 cm"	"Chromate 5 cm"	

Le solvant utilisé était l'alcool puisqu'il dissout à la fois le 3-4 benzopyrène et la plupart des colorants. Les essais étaient faits à une température voisine de -140°C puisqu'à ces températures, la fluorescence retardée, excitée directement est beaucoup plus intense qu'à -190°C.

Pour augmenter les chances de transfert, les colorants étaient dissous à saturation par agitation prolongée à 40°C et le 3-4 benzopyrène était dissous à la concentration de 1300 γ /cm3.

2° - Résultats

Dans ces conditions, avec le filtre "nitrite", on excite la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène en solution dans l'alcool saturé d'auramine.

Avec le même filtre, on excite la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène dans l'alcool saturé du sel de sodium de la fluorescéine. L'intensité de la fluorescence retardée est encore plus grande si l'on ajoute de la potasse dans l'alcool de façon à dissoudre la fluorescéine à une plus forte concentration.

Avec le filtre "chromate 2 cm" on excite la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène dissous dans de l'alcool saturé d'éosine.(x) Lorsque, dans

(x) Au moment de polycopier cette thèse, nous apprenons que C.A. PARKER et C.G. HATCHARD s'apprêtent à publier des résultats analogues, dans le cas d'hydrocarbures en solution à la température ordinaire.

cette expérience, on remplace le filtre "chromate 2 cm" par le filtre "chromate 5 cm" on ne diminue pas d'une façon appréciable l'intensité de fluorescence retardée de l'échantillon. Ce qui semble montrer que ce ne sont pas les photons de longueurs d'ondes inférieures à 5300 A qui excitent la fluorescence retardée mais plutôt ceux de longueurs d'ondes 5460 A (raie verte du mercure).

D'autres colorants (et certains hydrocarbures) ont été essayés dans les mêmes conditions et ne donnent aucune fluorescence retardée décelable du 3-4 benzopyrène bien que leurs spectres d'absorption soient proches de ceux de certains des colorants précédents. Ceci élimine un mécanisme d'excitation résultant uniquement de la chaleur dégagée dans l'échantillon lors de l'irradiation.

D'autre part, un échantillon congelé, d'une solution dans l'alcool de 3-4 benzopyrène pur à la concentration de 1300 γ par cm3, ne donnait vers -140°C avec le filtre "nitrite" qu'une fluorescence retardée extrêmement faible et même aucune fluorescence retardée décelable dans la plupart des expériences. Avec le filtre "chromate 2 cm" on n'a jamais décelé aucune fluorescence retardée d'échantillons de solutions alcooliques de 3-4 benzopyrène à la même concentration et dans les conditions de l'expérience d'excitation indirecte.

On a même contrôlé, dans une des expériences, que le même échantillon excité par de l'ultraviolet donnait une fluorescence retardée aussi intense qu'habituellement. Ceci confirme que ces filtres sont bien efficaces pour éliminer l'ultraviolet.

Il a été contrôlé que les colorants seuls ne donnaient pas de spectre de phosphorescence ressemblant au spectre de fluorescence du

3-4 benzopyrène.

L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau II. Nous y donnons aussi la localisation approximative du niveau premier singulet et du premier triplet des colorants et d'un hydrocarbure qui ont été utilisés.

Ces énergies sont donnés par la situation du maximum du spectre d'absorption et de celui de la courbe spectrale d'énergie du rayonnement de phosphorescence de grandes longueurs d'ondes.

Sur la figure 30, les résultats sont représentés schématiquement.

Dans ce schéma, les hauteurs des niveaux singulets ont été prises égales aux fréquences des axes de symétrie des spectres d'absorption et des courbes spectrales d'énergie des rayonnements de fluorescence.

La hauteur des niveaux premiers triplets a été évaluée pour les colorants en ajoutant à la fréquence du maximum de la courbe spectrale d'énergie du rayonnement de phosphorescence de grandes longueurs d'ondes, 700 cm^{-1}, pour tenir compte du déplacement probable, vers les grandes fréquences, du spectre d'absorption correspondant aux transitions $So \rightarrow T1$, par rapport au spectre de phosphorescence. Les surfaces hachurées horizontalement sont centrées sur les nombres d'onde ainsi obtenus, leur largeur indique le degré d'imprécision avec lequel les hauteurs de ces niveaux sont connus.

3° - Remarques

La luminescence $T \rightarrow S$ du sel de sodium de la fluorescéine, en présence du 3-4 benzopyrène, a un temps de décroissance de l'ordre de 2 secondes. La fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène, excitée indirectement dans la même solution par des photons absorbés uniquement par la fluorescéine, conserve un temps de décroissance très court. La constante de temps n'a pas été mesurée mais elle semble de l'ordre de grandeur du temps de décroissance de la fluorescence retardée de 3-4 benzopyrène excité directement.

Tableau II

Donneur d'énergie	Excitation de la Fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène	Maximum courbe spectrale d'énergie luminescence T ⟶ S	Maximum spectre d'absorption	Fréquences d'excitation
AURAMINE	+	17.700 cm-1	22.700 cm-1	24.400 cm-1
FLUORESCEINE (sel de sodium)	+	15.100 cm-1	21.500 cm-1	24.400 cm-1
EOSINE	+	14.850 cm-1	19.050 cm-1	20.000 cm-1
RHODAMINE B.	-	14.300 cm-1	18.950 cm-1	20.000 cm-1
ANTHANTHRENE	-	11.850 cm-1	23.100 cm-1	24.400 cm-1

Accepteur d'énergie	Hauteur du 1° triplet	Hauteur du 1° singulet
3-4 benzopyrène	14.670 cm-1	24.815 cm-1

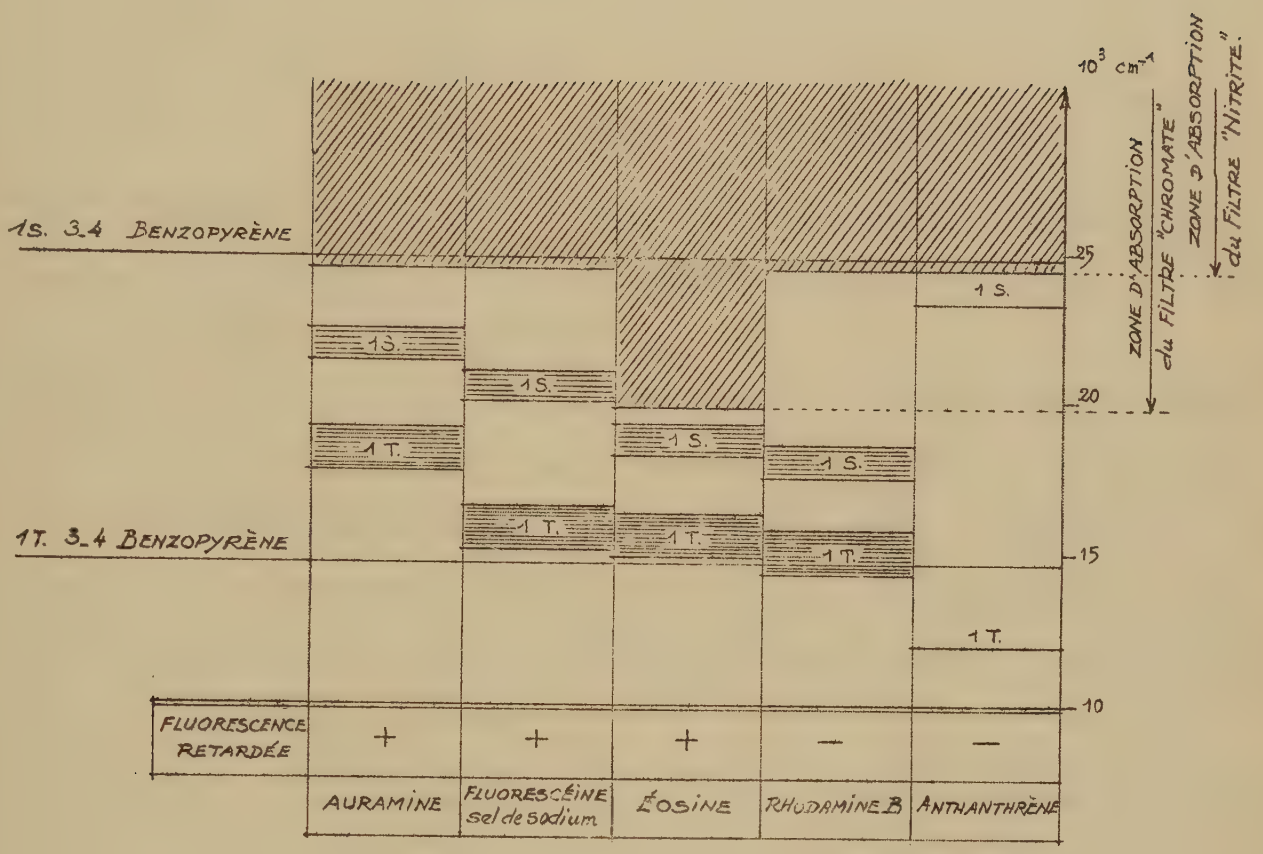


Figure 30

Schéma représentant les hauteurs des niveaux d'excitation des substances utilisées dans les expériences d'excitation indirecte de la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène par l'intermédiaire d'une substance colorée.

Les domaines d'absorption des filtres utilisés ainsi que les résultats positifs (+) ou négatifs (-) des expériences de transfert sont également indiqués.

Nous n'avons pu déceler la luminescence $T \rightarrow S$ du 3-4 benzopyrène (à 6815 A) lorsque sa fluorescence retardée est excitée indirectement par le colorant. Cependant la luminescence des colorants dans cette région est si intense qu'elle aurait probablement masqué celle du 3-4 benzopyrène si elle existait.

4° - Discussion

Les résultats de ces expériences d'excitation indirecte de la fluorescence retardée semblent bien indiquer qu'il suffise que le 3-4 benzopyrène soit porté dans son état premier triplet pour que la fluorescence retardée apparaisse.

En effet ce n'est que lorsque la hauteur du premier triplet de la molécule colorée ajoutée est supérieure à celle du premier triplet du 3-4 benzopyrène que la fluorescence retardée se manifeste. Or c'est cette disposition relative des niveaux qui est nécessaire pour que des transferts d'énergie d'excitation du type de FÖRSTER soient très probables (68).

D'autre part, des transferts d'énergie d'excitation du colorant dans son état premier singulet au 3-4 benzopyrène pour le porter directement dans son état premier singulet, semblent impossibles, puisque le 3-4 benzopyrène a un premier singulet excité plus haut que ceux des colorants utilisés (figure 30, tableau II). Dans le cas de l'éosine la différence des niveaux atteint 6000 cm^{-1}.

Dans ce dernier cas, le transfert d'énergie d'excitation d'une molécule d'éosine excitée dans son état premier singulet à un couple de molécules de 3-4 benzopyrène pour le porter à l'état complexe excité de FÖRSTER, AA^I, ne semble pas possible non plus. En effet, le maximum du spectre de fluorescence de l'éosine est déplacé de 500 cm^{-1} vers les

grandes longueurs d'ondes par rapport au maximum du spectre continu émis à la température ordinaire par une solution concentrée de 3-4 benzopyrène dans l'acétone (figure 31). Or ce fond continu est très probablement dû à l'émission des complexes AA^I de FÖRSTER, puisque son intensité, par rapport à celle des bandes de fluorescence des molécules de 3-4 benzopyrène isolées, augmente avec la concentration en 3-4 benzopyrène.

On pourrait objecter que l'éosine forme des dimères en solutions concentrée (69 et 36 p. 354). Comme ces dimères ont un niveau singulet un peu plus haut que celui du monomère (maximum du spectre d'absorption à 20.000 cm-1 au lieu de 19.050 cm-1 pour le monomère), le transfert d'énergie signalé ci-dessus pourrait devenir possible. Mais les faits suivants rendent très improbable cette éventualité :

a) Le dimère de l'éosine doit être très peu fluorescent, puisque son apparition explique l'auto-inhibition de la fluorescence des solutions concentrées d'éosine (36 p. 354). Il est donc probablement mauvais donneur d'énergie d'excitation.

b) Dans l'alcool ce dimère ne se forme pas en très grande proportion (36 p. 354).

c) L'énergie d'excitation qui est concentrée principalement dans la raie 5460 A du mercure, doit exciter beaucoup plus le monomère que le dimère (d'après la position relative des spectres d'absorption).

d) Le fait que la fluorescence retardée excitée par l'intermédiaire de l'éosine n'augmente pas sensiblement quand on diminue l'épaisseur de la solution de chromate de potassium traversée par la lumière excitatrice, confirme que c'est bien le rayonnement de longueurs d'ondes supérieures à 5200 A qui excite principalement la fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène. Or, le maximum d'absorption du dimère de l'éosine se situe à 5000 A et celui du monomère à 5250 A.

N/ - RAPPEL DES PRINCIPALES CONCLUSIONS QUI RESULTENT DE NOS EXPERIENCES

1° - L'absorption de deux photons d'excitation semble nécessaire à l'émission d'un photon de fluorescence retardée.

2° - Des quantas d'énergie inférieure à 20.000 cm-1 suffisent à provoquer le phénomène. Ceci semble indiquer qu'il suffit de porter

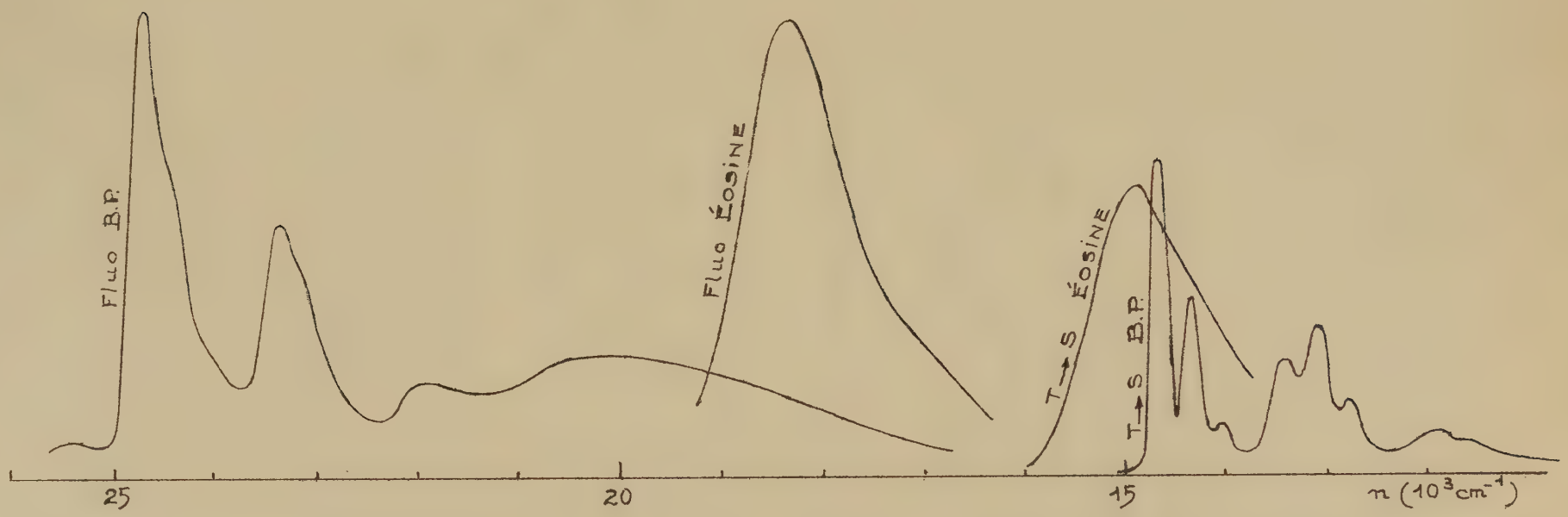


Figure 31

Courbes spectrales d'énergie :

Fluo B.P. = Fluorescence du 3-4 benzopyrène à la concentration d'environ 15 mg/cm3, dans l'acétone à la température ambiante.

Fluo Eosine = Fluorescence d'une solution très diluée d'éosine dans l'alcool à la température ambiante.

$T \rightarrow S$. B.P. = Luminescence $T_1 \rightarrow S_o$ du 3-4 benzopyrène, en solution dans l'alcool à -190°C.

$T \rightarrow S$ eosine = Luminescence $T_1 \rightarrow S_o$ de l'éosine en solution dans l'alcool à -190°C.

le 3-4 benzopyrène dans son état premier triplet pour que la fluorescence retardée se produise.

3° - Intervention d'une interaction entre certaines des molécules dissoutes.

4° - Elimination des mécanismes expliquant l'apparition de la fluorescence retardée par le passage d'une molécule de 3-4 benzopyrène de son état premier triplet à son état premier singulet par chocs thermiques ou par absorption d'un deuxième photon la portant dans l'état triplet supérieur Tn intermédiaire (état Tn révélé par l'absorption $T_1 \rightarrow T_n$).

5° - Intervention probable des chocs moléculaires dans le mécanisme.

6° - La décroissance de l'intensité, après l'interruption du flux d'excitation, paraît exponentielle. La constante de temps (inverse du coefficient du temps de l'exponentielle) de la décroissance de la fluorescence retardée est environ la moitié de celle relative à la luminescence $T \rightarrow S$.

7° - Les impuretés contenues dans les échantillons de 3-4 benzopyrène ne semblent pas nécessaires.

8° - La présence des gaz atmosphériques ne paraît pas nécessaire.

III - INTERPRETATION PROPOSEE

L'hypothèse que nous proposerons, est analogue à celle faite par PARKER et HATCHARD (64). Elle explique bien les conclusions mentionnées ci-dessus.

Cependant, il paraît difficile, avec cette hypothèse, d'expliquer tous nos résultats, en particulier ceux qui ont été obtenus à des températures supérieures à -150°C.

Nous envisagerons dans quel sens cette hypothèse pourrait être complétée ou modifiée, pour rendre mieux compte de l'ensemble de nos résultats.

A/ _ ENONCE DE L'HYPOTHESE

L'essentiel du mécanisme proposé peut se résumer dans l'équation suivante :

(Equation γ) $\quad 2\,A^{III} \longrightarrow A^{I} + A$

A étant une molécule de 3-4 benzopyrène dans l'état fondamental,
A^{I} étant une molécule de 3-4 benzopyrène dans son état premier singulet,
A^{III} étant une molécule de 3-4 benzopyrène dans son état premier triplet.

B/ - JUSTIFICATION

1° - Conservation de l'énergie

Le passage d'un couple de molécules de 3-4 benzopyrène excitées chacune dans son état premier triplet, à un couple formé par une

molécule dans l'état premier singulet et une molécule dans l'état fondamental, semble possible sans apport d'énergie, puisque la hauteur du niveau premier singulet excité du 3-4 benzopyrène est inférieure au double de la hauteur de son niveau premier triplet.

On pourrait supposer que le dernier couple est identique au complexe de FÖRSTER A A^I. Ce complexe pourrait ensuite être scindé en ses constituants, par collisions avec les molécules du solvant, en régénérant une molécule A^I capable d'émettre un photon de fluorescence retardée.

2° - Conservation du spin

Si les deux molécules de 3-4 benzopyrène dans leur état premier triplet sont placées l'une par rapport à l'autre, de façon à ce que leurs électrons découplés s'accouplent avec leurs spins dirigés en sens contraire, le spin total de l'ensemble des deux molécules, considéré comme un tout, sera nul. Cette paire de molécules sera dans un état qui peut être assimilé à un état singulet.

Ce dernier point pourrait lever l'interdiction du passage des états triplets aux états singulets, ce qui rendrait possible la transition envisagée.

COLPA a examiné en détail cette possibilité, par des calculs théoriques (70). Il a montré que, si deux molécules identiques d'hydrocarbures dans leur état premier triplet se rapprochent suffisamment et qu'elles se placent avec les plans des cycles parallèles (configuration en sandwich), la probabilité de la formation d'un complexe du type de FÖRSTER A A^I est égale à 3/9.

C/ - EXPLICATION DES PRINCIPALES CONCLUSIONS QUI RESULTENT DE NOS EXPERIENCES

1° - On peut voir que le mécanisme proposé nécessite bien l'absorption de deux photons pour l'émission d'un photon de fluorescence retardée.

2° - Il suffit de porter les molécules de 3-4 benzopyrène dans leur état premier triplet pour que l'émission se produise.

3° -Une interaction est nécessaire entre deux molécules A^{III}, ce qui explique que plus les solutions sont concentrées plus les chances d'interaction sont grandes.

4° - Les chocs moléculaires pourraient intervenir soit pour la formation d'une liaison entre les deux molécules A^{III}, soit pour la séparation des éléments du complexe A A^{I}, de FORSTER, qui se serait éventuellement formé.

5° - La décroissance exponentielle de la fluorescence retardée et le fait que la constante de temps τ soit, à peu près, la moitié de celle de la luminescence $T \rightarrow S$ peuvent s'expliquer de la façon suivante :

Supposons que les molécules A^{III} susceptibles d'interagir suivant le mécanisme (γ) aient une durée de vie peu modifiée par rapport à celle des molécules A^{III} isolées. Supposons, d'autre part, que les durées de vie d'éventuels états intermédiaires entre l'état initial et l'état final, seuls représentés dans l'équation (γ') , soient courtes par rapport à celle des molécules A^{III}.

Envisagons un couple de molécules A^{III} susceptibles d'interagir selon le mécanisme (γ') . Si les conditions précédentes sont réalisées, on peut écrire :

$$p = e^{-t/\tau}$$

étant la constante de temps de la décroissance de la luminescence $T \rightarrow S$, p étant la probabilité pour que l'une donnée des deux molécules du couple, dont les deux molécules sont dans l'état premier triplet à l'instant t = 0, soit encore dans l'état premier triplet au temps t.

La probabilité p' pour que la deuxième molécule du couple soit encore dans l'état premier triplet au temps t est aussi :

$$p' = e^{-t/\tau}$$

La probabilité P pour que les deux molécules du couple soient encore dans l'état premier triplet au temps t est donc :

$$P = p.p' = e^{-2t/\tau}$$

L'intensité de fluorescence retardée est, à tout instant, proportionnelle au nombre de couples dont les deux molécules sont excitées dans l'état premier triplet, puisque nous avons supposé la durée de vie d'éventuels états intermédiaires courte par rapport à celle de l'état triplet. Donc l'intensité I de la fluorescence retardée, après la coupure du flux excitateur, est de la forme :

$$I = Io.\ e^{-2t/\tau}$$

La décroissance est donc exponentielle, avec une constante de temps égale à la moitié de celle de la luminescence $T \rightarrow S$.

Comme, expérimentalement, on a trouvé à peu près ces résultats, il est probable que les conditions que nous avons admises sont réalisées ici. Si elles ne l'étaient pas, la constante de temps pourrait avoir une valeur quelconque, déterminée par exemple par la durée de vie d'éventuels états

intermédiaires à vie longue.

6° - L'équation ne fait intervenir ni les impuretés, ni les gaz atmosphériques.

7° - D'autre part, on peut rendre compte de la forte diminution de l'intensité de fluorescence retardée observée en présence d'iodure d'éthyle, d'une part par la diminution de la probabilité des transitions radiatives $S1 \longrightarrow So$, d'autre part par la diminution de la durée de vie des états triplets, qui rendrait la décroissance de la fluorescence retardée trop rapide pour qu'elle soit observable au phosphoroscope.

8° - Enfin, le fait que le 3-4 benzopyrène excité indirectement par un colorant dont l'état triplet a une longue durée de vie, conserve une durée de vie très faible, pourrait surprendre. Mais on peut admettre que seulement un certain nombre de molécules de colorant sont situées convenablement par rapport aux molécules ou couples de molécules de 3-4 benzopyrène pour pouvoir leur transférer leur énergie d'excitation, et que ces transferts se feraient très rapidement après que ces molécules de colorant aient été excitées dans leur état premier triplet, ce qui ne modifierait pas la durée de vie du phénomène de fluorescence retardée.

D/ - DIFFICULTES RENCONTREES POUR EXPLIQUER CERTAINS RESULTATS

1° - On a vu que, dans certaines conditions, l'intensité de la fluorescence retardée, à -140°C, pouvait être 50 fois plus forte que celle de la luminescence $T \rightarrow S$ et 700 fois moindre seulement que celle de la fluorescence vraie.

Or, d'après la concentration des solutions utilisées (1300 γ par cm3), on trouve, en supposant une répartition homogène des molécules

de 3-4 benzopyrène, que celles-ci sont en moyenne distantes de 70 A, donc séparées par un grand nombre de molécules de solvant (environ 20).

Pour expliquer que le mécanisme (γ') soit cependant assez probable, on peut envisager les deux possibilités suivantes :

a) L'interaction des deux molécules A^{III} pourrait se faire à grande distance (interaction du type de celle qui intervient dans les transferts d'énergie d'excitation à grande distance étudiés par FÖRSTER).

Mais il semble impossible, avec cette hypothèse, de rendre compte de l'effet du changement de longueur d'onde de la lumière excitatrice. D'autre part, aucun support théorique à cette idée n'a été trouvé. Nous avons donc préféré l'explication suivante, qui est appuyée par l'étude théorique de COLPA (70) :

b) Des molécules de 3-4 benzopyrène, en proportion importante se trouveraient réunies deux à deux, dans des mailles du réseau formé par les molécules du solvant congelé.

Cependant, il ne semble pas qu'à la température ordinaire, se manifeste une agrégation d'une grande proportion des molécules de 3-4 benzopyrène. En effet, le spectre d'absorption d'une solution de 3-4 benzopyrène à 500 γ /cm3 dans l'alcool, sous 0,1 mm d'épaisseur, est identique au spectre d'absorption d'une solution à 5 γ /cm3, sous 1 cm d'épaisseur.

Néanmoins, selon STEVENS, (59, 1960), il pourrait exister certaines formes d'association de molécules d'hydrocarbures, qui ne conduiraient pratiquement à aucun changement du spectre d'absorption.

D'autre part, il se peut qu'au refroidissement de solutions très

concentrées, les molécules de 3-4benzopyrène aient une tendance à s'accoupler. Ceci paraît même assez probable, puisque les solutions abandonnées liquides à température assez basse, déposent des cristaux de 3-4 benzopyrène. Or comment ne pas supposer qu'avant de former des microcristaux, les molécules commencent à s' agréger. Les agrégats peuvent être formés d'empilements de molécules avec leurs plans parallèles, puisque STEVENS a montré que le 3-4 benzopyrène, dans l'une de ses variétés cristallines, forme vraisemblablement de tels empilements (71). Ces empilements commencent probablement par être des couples de molécules placées dans des plans parallèles. La tendance des hydrocarbures aromatiques a former des couples en solution solide est confirmée par l'observation suivante de STEVENS (71). Le pyrène dissous a forte concentration dans la naphtalène ou le fluorène donne la bande de fluorescence observée dans les solvants liquides et attribuée par FÖRSTER à un dimère excité.

Or la disposition des molécules dans des plans parallèles, est celle qui est requise dans les calculs de COLPA pour que le mécanisme (7) soit possible.

Cependant, on peut voir que, même en supposant qu'une proportion importante des molécules de 3-4 benzopyrène forment des couples, il est peu vraisemblable qu'on puisse obtenir, dans le même temps, 50 fois plus de photons de fluorescence retardée que de photons de luminescence $T \rightarrow S$.

En effet, examinons les hypothèses que l'on doit faire pour expliquer ce rapport 50. Admettons que :

une pour 20.000 seulement des molécules portées dans l'état premier triplet donne de la luminescence $T \rightarrow S$ (Ceci concorderait avec le faible rendement de la phosphorescence $T \rightarrow S$ et sa décroissance assez rapide, 0,1 s à -140°C),

la proportion des molécules dans leur état premier triplet, au cours de l'irradiation, est de 10% (elle ne peut être plus élevée puisqu'on observe, à peu près, la proportionnalité de l'intensité de luminescence $T \rightarrow S$ à l'éclairement d'excitation),

50% des molécules de 3-4 benzopyrène forment des couples susceptibles de donner de la fluorescence retardée,

1/10 seulement de ces couples donne de la fluorescence retardée (pour expliquer que la durée de vie de l'état triplet soit la même, que les molécules fassent ou non partie de ces couples).

Avec ces suppositions on devrait observer pour la fluorescence retardée l'émission de 1 photon par 400 molécules toutes les secondes et pour la luminescence $T \rightarrow S$, l'émission de 1 photon par 20.000 molécules toutes les secondes. Ce qui conduit bien à l'émission de 50 fois plus de photons de fluorescence retardée que de luminescence $T \rightarrow S$.

Mais il semble improbable que 10% des molécules de 3-4 benzopyrène puissent s'accumuler dans l'état premier triplet, puisque la désexcitation non radiative a été supposée très intense.

On pourrait penser qu'il intervient un mécanisme de collection de l'énergie d'excitation par les couples, à la suite de transferts $T \rightarrow T$ d'énergie d'excitation de proche en proche, de molécule de 3-4 benzopyrène à molécule de 3-4 benzopyrène, d'une façon analogue à ce qui est observé dans les luminescences sensibilisées dans les cristaux aromatiques. Il faut alors supposer que l'énergie, une fois transférée sur un couple ne pourrait plus être transférée à une molécule isolée voisine. Ceci expliquerait bien qu'à la température donnant le maximum d'intensité de fluorescence retardée on ait parfois observé un minimum de l'intensité de luminescence $T \rightarrow S$, correspondant à une dépopulation du niveau T par le mécanisme de fluorescence retardée. Mais il semble que deux molécules doivent être assez proches (distance de l'ordre de 15 A) pour qu'un transfert $T \rightarrow T$ soit possible (67)(x). Or la distance moyenne des molécules de 3-4 benzopyrène dans nos solutions les plus concentrées est de l'ordre de 70 A.

(x) Cependant, MOODIE M.M. et REID C. (J. Chem. Phys. 20, 1510, 1952) ont suggéré qu'entre des molécules de même espèce, un mécanisme un peu différent de celui de FORSTER, pourrait conduire à des distances de transfert assez grandes.

2° - L'influence relativement faible du temps de refroidissement de la solution, sur l'intensité de la fluorescence retardée, semble "a priori" aller contre l'hypothèse de la nécessité de la formation de couples au refroidissement puisque plus ce temps est long, plus la probabilité de la formation des couples devrait être grande. Cependant, il se peut que la proportion des couples varie peu avec ce temps, puisque leur formation serait immédiatement suivie d'une agrégation plus importante des molécules de 3-4 benzopyrène et que ces agrégats ne sont peut-être pas susceptibles de concourir à la fluorescence retardée en raison d'une plus grande stabilité.

3° - Si l'absorption des photons responsables de la fluorescence retardée est faite par les molécules de 3-4 benzopyrène isolées ou faisant partie de couples de molécules rapprochées mais en interaction faible, il ne semble pas qu'on puisse interpréter les résultats obtenus par le changement de la longueur d'onde d'excitation. En effet, le rayonnement de longueur d'onde 3650 Å, fortement absorbé par les molécules isolées de 3-4 benzopyrène devrait donner, à nombre de photons absorbés égaux, une plus grande probabilité d'excitation double des couples, que le rayonnement de longueur d'onde 3130 Å, plus faiblement absorbé par les molécules de 3-4 benzopyrène isolées.

Pour rendre compte du résultat obtenu, il faudrait supposer que les photons responsables de la fluorescence retardée soient absorbés par des couples de molécules de 3-4 benzopyrène en interaction suffisamment forte pour que le spectre d'absorption soit modifié (cette interaction ne devrait cependant pas modifier la durée de vie des molécules dans l'état premier triplet, si le calcul que nous avons donné de la vitesse de dé-

croissance de la fluorescence retardée est valable).

4° - Il est difficile d'expliquer qu'on n'ait pas toujours observé une proportionnalité de l'intensité de fluorescence retardée au carré de l'intensité du rayonnement excitateur. Dans le xylène à -140°C, ce n'est qu'aux plus forts éclairements d'excitation qu'on observe une diminution de la pente de la courbe qui représente la variation de l'intensité de fluorescence retardée en fonction de l'éclairement d'excitation (en coordonnées doublement logarithmiques). Dans le cas où on admettrait une collection de l'énergie d'excitation par les couples de molécules susceptibles de donner de la fluorescence retardée, il se pourrait que ceci soit dû à ce qu'une grande proportion des couples ont l'une de leurs deux molécules excitée, aux forts éclairements. Mais dans l'alcool dégazé, à la température donnant le maximum d'intensité de fluorescence retardée, cette explication ne serait plus valable puisqu'il semble que la courbe de variation de l'intensité de fluorescence retardée en fonction de l'éclairement excitateur soit une droite en coordonnées doublement logarithmiques.

5° - Le fait que les variations de température ne sont pas toujours suivies immédiatement (c'est-à-dire dans un délai inférieur à une minute) de la variation correspondante de l'intensité de fluorescence retardée, et que cette variation ne se produise, dans certains cas, qu'en présence de la lumière excitatrice, semble inexplicable dans le cadre du mécanisme (γ) et avec l'interprétation que nous avons donné à l'effet de la température. Il se pourrait qu'interviennent ici des modifications de la structure des solvants congelés, ou des modifications dans l'interac-

tion des molécules des couples, avant l'excitation de celles-ci.

E/ - HYPOTHESES COMPLEMENTAIRES

Donc, si le mécanisme (γ) explique bien les principales conclusions qui résultent des expériences, on éprouve d'assez grandes difficultés à expliquer en détail toutes les expériences. Probablement, l'hypothèse est trop simplifiée et le mécanisme réel, bien que ressemblant au mécanisme (γ) , est plus complexe.

Nous examinerons brièvement si une addition (ou une retouche) à l'hypothèse de départ ne serait pas susceptible de fournir une explication plus complète.

L'hypothèse additionnelle de l'existence d'une assez grande proportion de couples de molécules de 3-4 benzopyrène rapprochées dans les solutions congelées, a déjà été présentée au paragraphe précédent.

Pour que les chances d'excitation double des couples soient plus grandes, on pourrait imaginer que les couples A A^{III}, puissent former des associations, que nous symboliserons par (A A^{III}), dans lesquelles l'énergie d'excitation serait transformée en une forme plus stable d'énergie. Par exemple, l'un des deux électrons découplés par la formation de l'état premier triplet, pourrait émigrer sur la molécule voisine non excitée, pour former une sorte de biradical qui serait constitué par une paire d'ions, dont la durée de vie serait peut-être beaucoup plus longue que celle de l'état premier triplet du 3-4 benzopyrène. Une excitation ultérieure de l'élément (A A^{III}) provoquerait la séparation des deux molécules, en fournissant deux molécules excitées dans l'état premier triplet (ou, même, directement une molécule dans l'état premier singulet

et l'autre dans l'état fondamental, ce qui reviendrait alors à modifier le schéma (5) .

La possibilité de la formation de paires d'ions (ou complexes par transfert de charge) chez les molécules d'hydrocarbures aromatiques, à partir de quanta d'énergie assez faible, a été suggéré par LYONS (72), FERGUSON (58) et ELEY (73), pour expliquer la semi-conductivité et la photoconductivité des cristaux. D'après les résultats de LYONS, l'énergie de formation d'une paire d'ions dans les cristaux, serait du même ordre que celle de l'état triplet des molécules isolées. L'hypothèse de ELEY est que les électrons passeraient plus facilement, par effet tunnel, au travers de la barrière de potentiel séparant deux molécules, quand ils sont excités (x), (xx)

La durée de vie des éléments (A A^{III}) ne devrait pas dépasser quelques secondes, sinon on n'observerait pas la proportionnalité de l'intensité de fluorescence retardée au carré de l'éclairement excitateur, puisque les grilles réductrices de l'éclairement ne sont laissées en place que 10 secondes environ.

Cette durée de vie peut cependant varier suivant les conditions expérimentales, ce qui expliquerait qu'on n'ait pas toujours observé la proportionnalité de l'intensité de fluorescence retardée au carré de l'éclairement d'excitation.

La formation d'intermédiaires (A A^{III}) à partir de couples A A^{III}

(x) Nous remercions M. le Professeur ROUSSET, qui nous a signalé l'existence de ces travaux et la possibilité de l'intervention de ce processus dans les phénomènes de fluorescence retardée.

(xx) FERGUSON (58) admet que ce sont des paires d'ions qui émettent le rayonnement continu de grandes longueurs d'ondes observé dans la fluorescence des cristaux et des solutions concentrées de pyrène. Ceci est en accord avec l'idée que la formation de ces paires d'ions est une étape du mécanisme conduisant à la fluorescence retardée.

nécessite, peut-être, que soit fournie une certaine énergie thermique, et la variation d'intensité de fluorescence retardée en fonction de la température traduirait des variations dans la concentration en ($A\ A^{III}$). Si cet intermédiaire pouvait avoir, dans certains cas, une durée de vie très longue, la variation de l'intensité de fluorescence retardée correspondant à une variation de température ne se produirait que lentement et en présence du rayonnement d'excitation. Il est possible que le passage par l'état ($A\ A^{III}$) n'intervienne que pour les températures supérieures à -150°C, domaine de température dans lequel apparaissent les principales difficultés d'interprétation par le mécanisme (γ'). Les deux barrières de potentiel trouvées seraient, peut-être : la plus haute, relative à la formation de ($A\ A^{III}$) et la plus basse, relative au mécanisme (γ').

L'effet du changement de la longueur d'onde d'excitation s'explique bien avec l'hypothèse d'un passage par un état ($A\ A^{III}$). Mais ces expériences ayant été faites à -190°C, température à laquelle on suppose que cet état intermédiaire n'intervient pas, il faudrait probablement conserver, ici, l'explication proposée plus haut.

Il reste difficile d'expliquer que, dans le cas de l'excitation indirecte en présence d'un colorant, la variation lente d'intensité de fluorescence retardée, consécutive à un changement de température, semble se produire en l'absence de rayonnement d'excitation. Mais le mécanisme d'excitation est ici différent.

L'hypothèse du passage par un état ($A\ A^{III}$) de longue durée de vie est donc encore d'un caractère assez spéculatif. Elle demanderait à être appuyée par des arguments théoriques et expérimentaux plus nombreux. Cependant elle pourrait servir de base à de nouvelles recherches sur le

phénomène que nous avons étudié.

F/ - CONCLUSIONS

L'interprétation que nous avons proposée est donc loin d'être définitive. D'autre part, une observation très récente (74), nous invite à la prudence dans nos conclusions : la fluorescence retardée du pérylène en solution dans l'hexane à -190°C, nécessiterait la présence d'impuretés (vraisemblablement aromatiques) dans le solvant.

Même si l'hypothèse avancée ne devait pas être retenue dans l'avenir, son utilité aura été de nous suggérer l'expérience dans laquelle nous avons excité une luminescence par des longueurs d'ondes supérieures à celles de cette luminescence, ce qui, à notre connaissance, n'avait pu être fait jusqu'à présent, sans irradiation préalable de l'échantillon par une lumière de longueur d'onde plus courte (phosphorescence "frozen in" (75), induite par des rayonnements peu énergiques).

Si notre interprétation était exacte, cette expérience montrerait la possibilité d'obtenir, à partir de photons peu énergiques, des photons plus énergiques, sans que la différence ait besoin d'être fournie à l'avance ou empruntée au milieu. Ceci pourrait présenter un certain intérêt pratique.

CHAPITRE V

FLUORESCENCE ET APPLICATION A LA DETECTION ET AU DOSAGE

Les études présentées dans ce chapitre ont été faites principalement pour essayer d'améliorer les techniques de détection et de dosage d'hydrocarbures aromatiques à l'état de traces au sein de mélanges complexes de composition inconnue et comportant un grand nombre de composés (goudrons).

Les techniques ont été mises au point avec le 3-4 benzopyrène considéré comme un hydrocarbure typique et qui nous intéressait par ailleurs pour sa forte activité cancérogène; mais elles doivent pouvoir être appliquées à tout hydrocarbure dont le rendement de fluorescence est élevé et dont les bandes de fluorescence sont fines ou s'affinent à basse température.

Les techniques de dosage classiques (76) consistent à soumettre les mélanges à analyser à des chromatographies successives sur silice, alumine et quelquefois papier. A chaque chromatographie, on enregistre les spectres de fluorescence et d'absorption d'un certain nombre de fractions d'éluat.

On rassemble ces fractions pour les soumettre à nouveau à une chromatographie. On continue ce processus jusqu'à ce qu'on n'obtienne

plus d'amélioration dans la ressemblance des spectres des éluats avec ceux de la substance recherchée. A ce niveau de purification, on pratique un dosage par spectrophotométrie d'absorption ou, plus rarement, de fluorescence. Sur la figure 32, on a représenté les spectres obtenus à divers stades du fractionnement d'un goudron de cigarette en vue d'un dosage du 3-4 benzopyrène.

Dans certains cas, le mélange est si complexe qu'aux premières chromatographies aucune indication n'est fournie par les spectres sur la présence du composé à doser; on est obligé de conserver pour être chromatographiées à nouveau, toutes les substances éluées par un solvant dont on sait qu'il élue assez facilement la substance cherchée. Il est d'autre part prudent, tant que les bandes caractéristiques n'apparaissent pas d'une façon très nette, de récupérer pour la chromatographie suivante, en plus de la fraction où le composé se signale, un certain volume d'éluat avant et après cette fraction. Cette difficulté contribue à rendre plus lent l'enrichissement des mélanges dans le composé à doser. Par exemple pour enrichir suffisamment en 3-4 benzopyrène un goudron de fumée de cigarette, afin de permettre un dosage par spectrophotométrie d'absorption, il faut environ 7 chromatographies ce qui ne peut se faire en moins de 15 jours. D'autre part, à chaque chromatographie, il y a des risques de pertes de substances comme le montre une expérience faite sur du 3-4 benzopyrène pur, où, en laissant séjourner 24 heures cette substance fixée sur une colonne d'alumine, on constate une perte de 30% du benzopyrène en présence de lumière et de 10% dans l'obscurité. Ces pertes sont d'ailleurs confirmées par des expériences de surcharges où est ajoutée une certaine quantité de 3-4 Benzopyrène à un goudron naturel. La différence

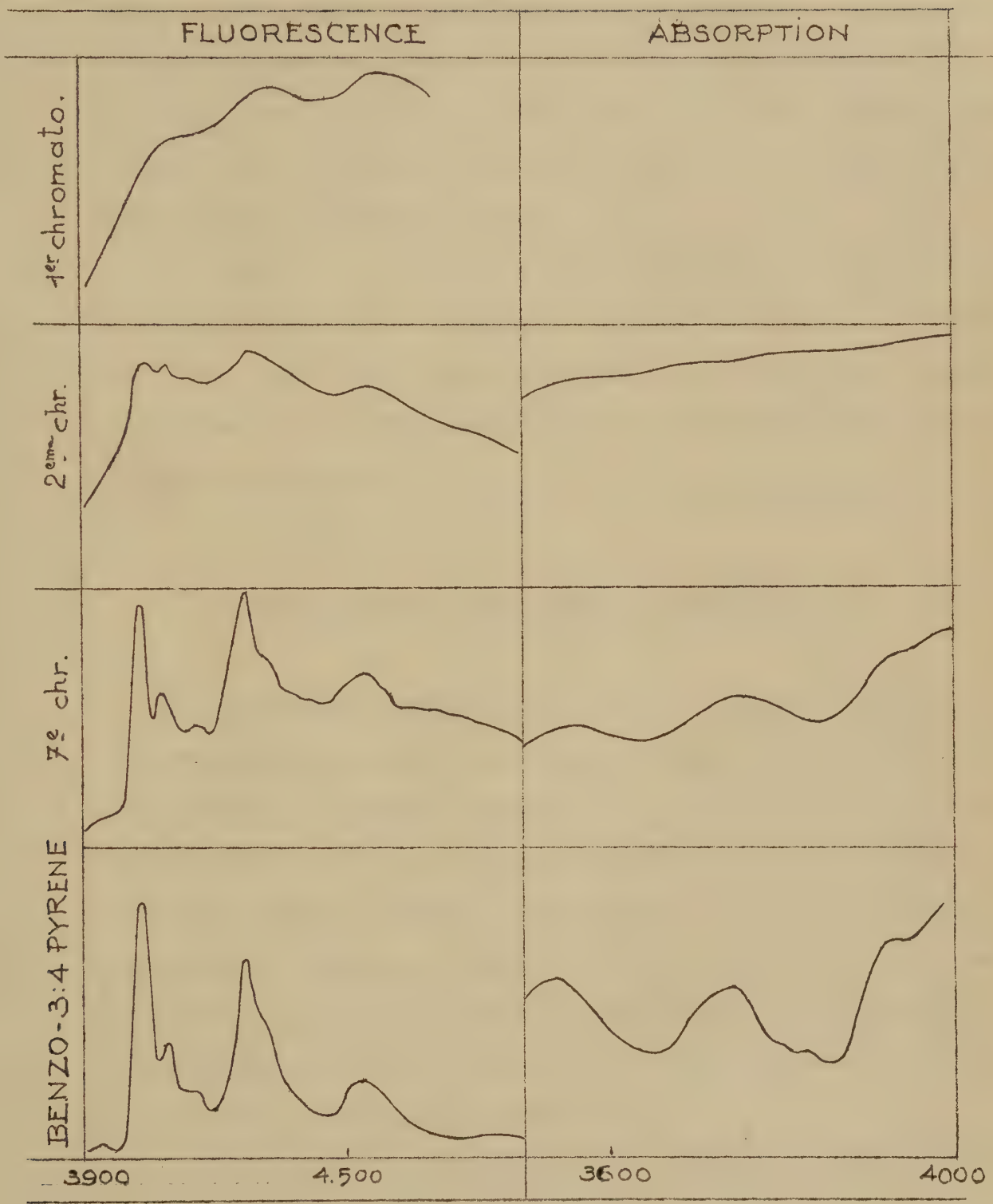


Figure 32

Chromatographies d'un goudron en vue de la détection du 3-4 benzopyrène. Evolution des spectres de fluorescence et d'absorption à la température ambiante.

entre la surcharge et le supplément de 3-4 benzopyrène à la fin des chromatographies indique la perte. Ces pertes sont variables suivant la composition du mélange analysé mais, dans certains cas particulièrement défavorables, elles peuvent être très grandes, (moins de 5% du benzopyrène ajouté, retrouvé après 7 chromatographies).

Donc, pour gagner du temps et diminuer les pertes, il y a intérêt à affiner les méthodes spectrophotométriques de détection et de dosage, de façon à sélectionner avec plus de certitude les fractions contenant la substance à doser et à pouvoir effectuer les dosages à un niveau moins poussé de purification.

Le dosage par Spectrophotométrie d'absorption

La méthode classique la plus utilisée est celle où l'on mesure sur les spectres, en densité optique, l'émergence d'un pic caractéristique au dessus de la droite joignant les pieds de ce pic, à la fois pour la solution à doser et pour une solution étalon de substance pure de concentration connue. On déduit de cette mesure la quantité de substance contenue dans la solution, en admettant que la densité optique d'une certaine épaisseur de solution de la substance recherchée est proportionnelle à la concentration. Ce dernier point doit être vérifié auparavant à l'aide de diverses dilutions de cette substance pure.

En procédant ainsi, on diminue la perturbation apportée par l'absorption de fond due aux impuretés (76). Cette perturbation subsiste, cependant, si l'absorption de fond est importante par rapport à l'émergence du pic et que la courbe spectrale des densités optiques des substances

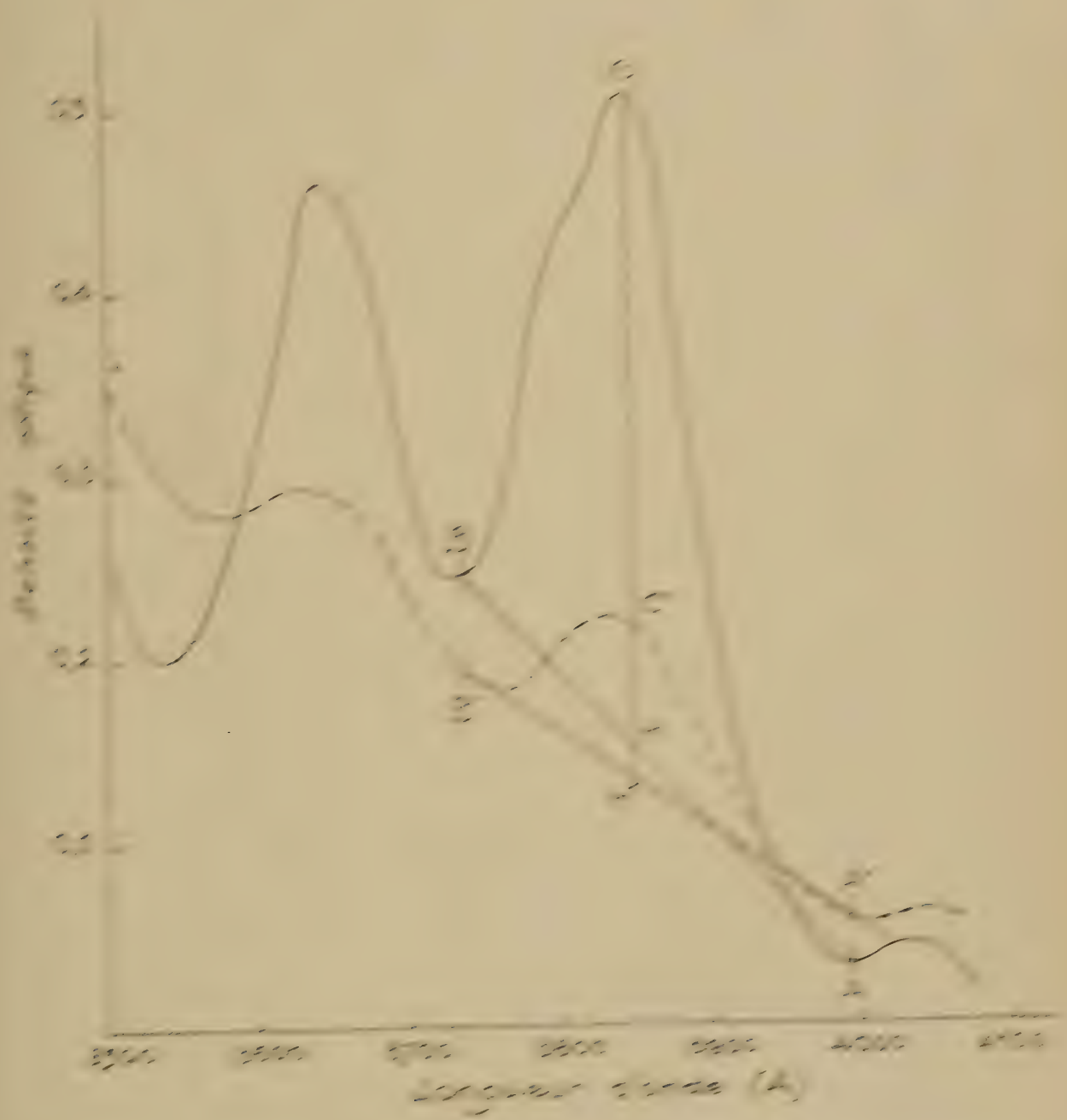
étrangères n'est pas assimilable à une droite (figure 33).

D'une façon plus précise, considérons le cas du 3-4 benzopyrène. Sur la figure 2 est représenté le spectre des densités optiques d'une solution de 5 γ de 3-4 benzopyrène par cm3 de cyclohexane contenant 10% de benzène. La bande 3845 A est encadrée par deux minima situés à 3735 A et 3990 A. Soient C, B, A, ces trois points remarquables, et C', B', A', les points correspondants, de mêmes longueurs d'ondes, de la courbe spectrale des densités optiques de la solution à doser (figure 33). La droite C C', parallèle à l'axe des densités optiques coupe la droite A B en H et A' B' en H'. Comme il a été vérifié auparavant que la densité optique de solutions de 3-4 benzopyrène aux points utilisés pour le dosage est proportionnelle à la concentration entre 0,5 et 10 γ /cm3, la concentration de la solution à doser est, en γ de 3-4 benzopyrène, par cm3 :

$$q = 5 \frac{C'H'}{C\ H}$$

Remarques en faveur de l'utilisation de la fluorescence pour les dosages du 3-4 benzopyrène

1) - Si l'on considère les spectres de la figure 32, on peut remarquer que la fluorescence donne de meilleurs résultats qualitatifs que l'absorption. A la seconde chromatographie, le spectre d'absorption de la fraction contenant le 3-4 benzopyrène ne donne qu'une indication très incertaine de la présence de ce composé alors que les principales bandes de fluorescence du 3-4 benzopyrène sont décelables. A la 7° et dernière chromatographie, la ressemblance du spectre de fluorescence de l'éluat avec celui du 3-4 benzopyrène est frappante, ainsi qu'on peut le constater plus aisément sur la figure 34, alors que le spectre d'absorption est très perturbé par les substances étrangères. Donc, la fluorescence permet une sélection plus précoce des échantillons et est un meilleur critère d'identification que l'absorption. Cet état de choses résulte probablement de ce que le 3-4 benzopyrène, ainsi que la plupart des hydrocarbures aromatiques, a un rendement de fluorescence élevé et des



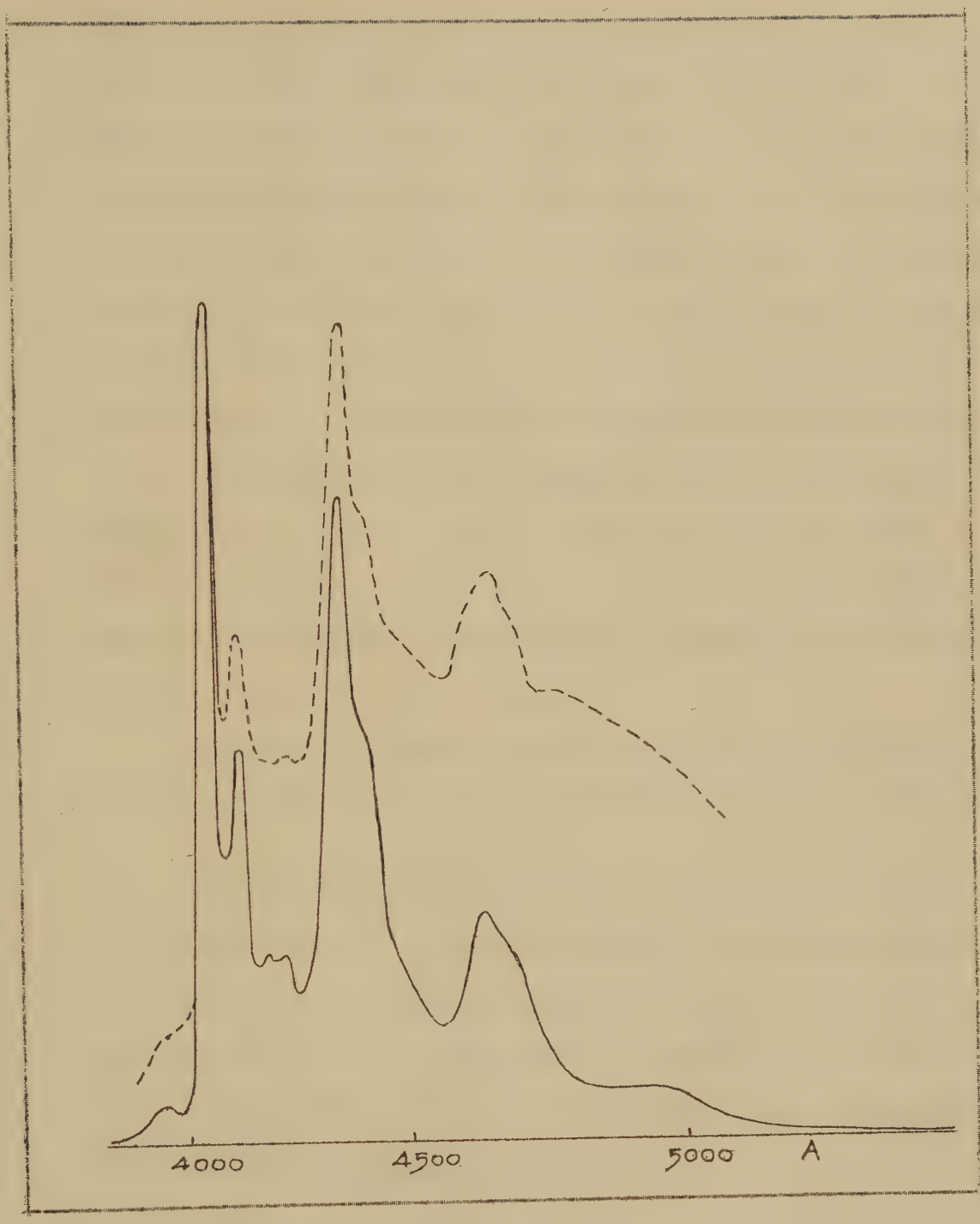


Figure 34

Comparaison des spectres de fluorescence à la température du laboratoire, du 3-4 benzopyrène et d'un extrait de fumée de cigarette.

_____ 3-4 benzopyrène

------- Extrait des produits de combustion de cigarette

bandes assez fines, propriétés peu fréquentes si l'on considère l'ensemble des substances organiques; ceci permet de le distinguer de ces dernières plus facilement que par absorption, puisque la majorité des substances organiques absorbe assez fortement dans le proche ultravidet. La finesse des bandes intervient comme facteur favorable, d'une part, en provoquant des accidents plus spécifiques dans les spectres des mélanges parce que mieux localisés, et, d'autre part, en concentrant l'énergie émise par le corps recherché dans des régions spectrales restreintes. Pour un même rendement de la fluorescence totale, cela donne de meilleurs rendements par unité de longueur d'onde au niveau des maximums et permet aux bandes d'émerger mieux d'un fond continu. On ne peut évidemment profiter de ces avantages qu'en analysant le spectre avec une largeur de bande au plus égale à celle des pics.

Ces qualités de sélectivité et spécificité de la détection par fluorescence incitent à utiliser quantitativement cette technique.

2) - C'est un fait bien connu que l'observation de la fluorescence des substances dont le rendement de fluorescence est assez grand, peut être faite sur des solutions extrêmement diluées; donc la quantité de substance nécessaire pour enregistrer un spectre de fluorescence est très réduite. Par exemple, 1/100 de γ de 3-4 benzopyrène est suffisant pour observer son spectre de fluorescence dans de bonnes conditions, alors qu'avec 1/10 de γ, le spectre d'absorption est à peine décelable. Donc, la détection par fluorescence n'exige pas de partir d'une aussi grande quantité de matériaux à analyser que celle par absorption. Par exemple, dans la détection par absorption du 3-4 benzopyrène dans la fumée de ci-

garette, on est amené à brûler environ 1000 cigarettes, alors que pour celle par fluorescence, 100 ou même 10 cigarettes devraient suffire. Sans compter l'économie, le fait de partir d'une moins grande quantité de matières premières est intéressant parce que cela facilite les séparations chromatographiques. En effet, pour une bonne séparation d'une grande quantité de substance, il faut de très grosses colonnes qui deviennent vite fort encombrantes.

Donc, la sensibilité de la détection par fluorescence est une autre raison en faveur de son utilisation quantitative (x).

Difficultés inhérentes aux dosages par fluorescence

L'utilisation de la fluorescence pour les dosages se heurte à des difficultés qui ont fait que, jusqu'à présent, la plupart des auteurs préfèrent utiliser exclusivement l'absorption pour la détection quantitative. Ces difficultés et les moyens de les pallier ont été examinés par plusieurs auteurs, notamment par BOWEN et WOKES (77). Cependant il convient de rappeler ici brièvement ces notions étant donné qu'elles ont joué un rôle primordial dans l'élaboration de notre technique. Il sera montré également que si les difficultés sont sérieuses, les moyens de les surmonter sont simples et efficaces.

(x) On profitera au maximum de cette dernière qualité dans le cas de l'enregistrement photoélectrique direct des spectres de fluorescence, puisqu'alors l'observation des plus petites quantités de substance n'augmentera pas le temps d'enregistrement.

Un dosage par fluorescence, pratiqué sans précautions spéciales c'est-à-dire par simple comparaison de la hauteur d'un pic caractéristique de la solution à doser avec la hauteur du pic correspondant d'une solution étalon de concentration connue, et en supposant pour le calcul une relation de proportionnalité entre la concentration de la substance dissoute et la réponse de l'appareil de mesure, donne souvent un résultat inexact.

Plusieurs phénomènes contribuent à fausser les résultats :

1) - Aux fortes concentrations, la réponse de l'appareil n'est pas proportionnelle à la concentration. La principale raison est qu'aux concentrations les plus élevées, le rayonnement excitateur est complètement absorbé dans une couche très mince de solution. Par exemple, avec la disposition que nous employons, où l'excitation et l'observation se font par la même face de la cuve, et où les rayons excitateurs et d'observation font entre eux des angles inférieurs à 90° (fig. 8) nous pouvons définir une épaisseur utile qui est la plus petite des trois dimensions suivantes :

- Profondeur de champ de l'appareil
- Epaisseur de la cuve
- Profondeur à laquelle le faisceau excitateur est encore suffisamment focalisé pour pouvoir donner un éclairement important.

Lorsque la couche de solution d'où est émis 99% du flux de fluorescence devient inférieure à l'épaisseur utile, la brillance apparente de la surface de la cuve dans la direction de l'appareil est pratiquement constante quand on augmente la concentration (si le rendement de fluorescence est indépendant de la concentration) puisque tous les photons entrés par cette face de la cuve dans une surface vue par le photomultiplicateur,

excitent la solution dans une région où le faisceau excitateur est bien focalisé et qui est vue par le photomultiplicateur (figure 35). Donc la comparaison de la réponse obtenue avec une solution à doser et une solution étalon à ces concentrations ne pourrait conduire à un dosage. Pour des concentrations inférieures, la comparaison devrait être faite avec deux solutions de même concentration. Ce n'est qu'aux très faibles concentrations, lorsque la solution absorbe peu le rayonnement excitateur, que l'on peut avoir une relation de proportionnalité.

Deux autres raisons empêchent qu'il y ait proportionnalité entre les réponses de l'appareil et les concentrations des solutions d'un corps pur : ce sont les phénomènes de réabsorption du rayonnement de fluorescence par la solution elle-même, et de l'inhibition de la fluorescence d'une molécule du fait de la proximité d'une autre molécule identique (auto-inhibition). Ces phénomènes ont tendance à diminuer quand la dilution augmente. Comme la solution devient plus transparente au rayonnement de fluorescence, la réabsorption diminue avec la concentration. D'autre part, comme l'espacement moyen entre les molécules de soluté diminue, leurs interactions deviennent plus faibles et les chances d'extinction de la fluorescence d'une molécule de soluté par une autre diminuent.

2) - La présence de substances étrangères peut diminuer le rendement de fluorescence du produit à doser, soit par réabsorption de son rayonnement, soit par diminution du nombre de photons émis (quenching). Ici encore, ces phénomènes ont tendance à disparaître quand la dilution augmente, pour les mêmes raisons que celles signalées au paragraphe précédent.

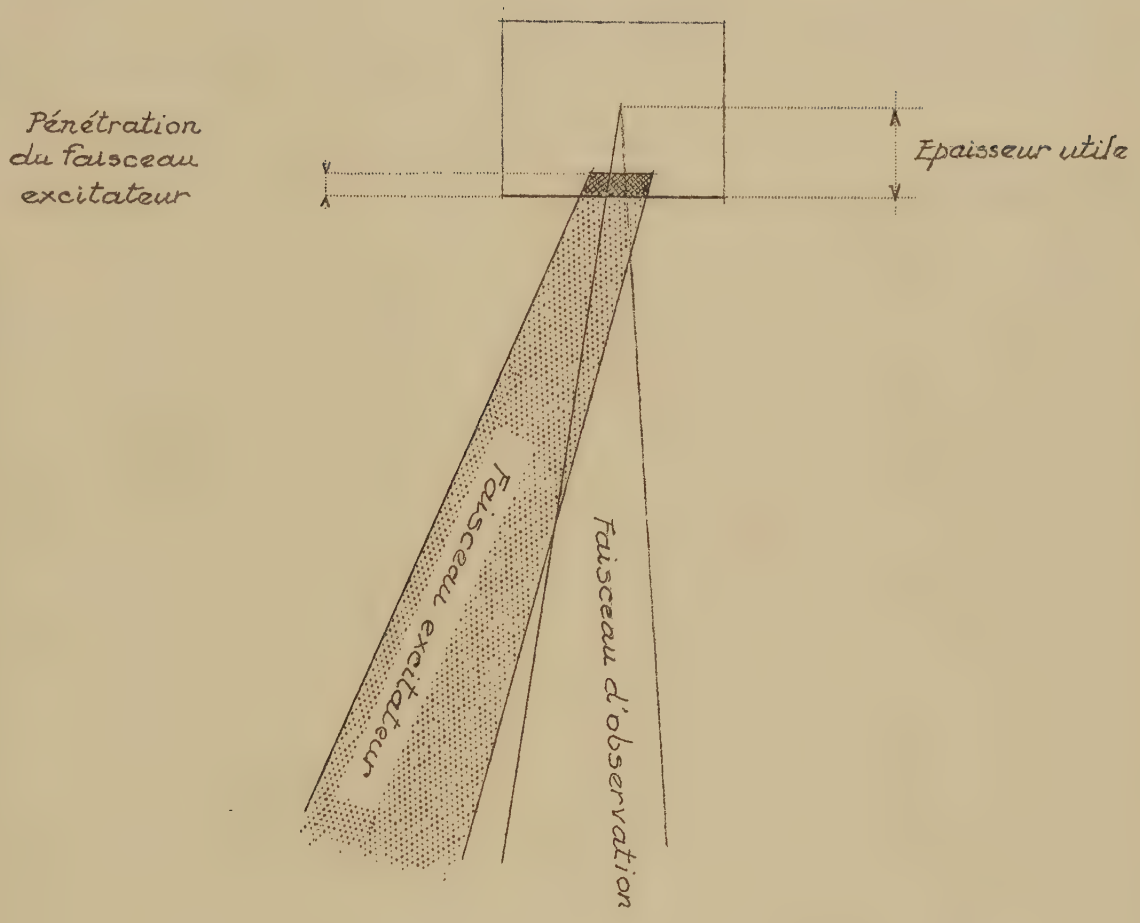


Figure 35

Détection de la fluorescence de solutions très concentrées.

Le dosage en fluorescence par dilutions successives

Puisque les difficultés signalées au paragraphe précédent ont tendance à s'atténuer quand la concentration des solutions diminue, un premier procédé de dosage consiste à opérer comme suit :

Soit par exemple une solution complexe comprenant du 3-4 benzopyrène à une concentration de l'ordre de 10 γ par cm3. Comparons l'émergence de son pic à 4030 à l'émergence du pic à la même longueur d'onde d'une solution de 3-4 benzopyrène pur à la concentration de 10 γ /cm3 dans le même solvant. La hauteur du pic de la solution étalon est quatre fois plus grande que celle de la solution à doser. En admettant une relation de proportionnalité entre la concentration et la hauteur des pics, on attribue à la solution à doser une concentration en 3-4 benzopyrène de 2,5 γ par cm3. Diluons au 1/10 à la fois la solution à doser et la solution étalon et comparons une seconde fois la hauteur des pics; nous obtenons cette fois-ci pour la concentration de la solution à doser, diluée au 1/10 : 7/10 γ /cm3, ce qui fait pour la solution non diluée 7 γ /cm3. Cette augmentation du résultat du dosage indique que la dilution a atténué les phénomènes signalés plus haut d'une façon plus sensible dans la solution à doser que dans la solution étalon. On continue les dilutions successives et on note à chaque fois le résultat calculé pour la solution non diluée. On obtient les résultats suivants :

Dilutions	Résultats γ/cm3
1	2,5
1/10	7
1/100	9,5
1/1000	10,1

Ces nombres sont empruntés à une expérience de vérification. La solution à doser est un mélange exempt de 3-4 benzopyrène (obtenu par chromatographie à partir d'un goudron) auquel on a ajouté 10 γ par cm3 de 3-4 benzopyrène. Le résultat constitue donc une vérification de la précision de la technique de dosage.

Des dilutions plus grandes feraient intervenir d'autres phénomènes comme la fluorescence de la cuve, celle du solvant, les raies Raman du solvant, des fluctuations très grandes du courant de mesure qui diminueraient la précision; mais cependant on voit que les résultats obtenus avec les deux plus grandes dilutions sont très peu différents, donc que les perturbations qui diminuent rapidement avec la concentration sont devenues peu importantes. Pour tenir compte des perturbations éventuelles qui ne dépendraient que peu de la concentration, on peut dissoudre, comme le proposent KLING et HEROS (19), le 3-4 benzopyrène des solutions étalon, non pas dans le solvant pur, mais dans une dilution assez grande de la solution à doser (pour ne pas augmenter sensiblement la quantité de 3-4 benzopyrène contenue dans ces solutions). Par exemple, ici, on aurait fait les solutions de 3-4 benzopyrène dans une dilution à 1/50.000 de la solution à doser, ce qui n'aurait augmenté que de 2% la quantité de 3-4 benzopyrène contenue dans la solution étalon la plus diluée (celle au 1/1000).

Le dosage en fluorescence par surcharge

La technique précédente oblige à utiliser des solutions très diluées, ce qui conduit à diminuer le nombre de photons qui arrivent sur le récepteur par unité de temps. Dans ces conditions, avec la méthode de détection photoélectrique, la précision est moins bonne, puisque les

fluctuations du courant de mesure sont plus grandes (bruit de photons) et, avec la méthode de détection photographique, le temps de mesure est augmenté. D'autre part, il se peut que dans certains cas, bien que cela soit peu probable, aux dilutions les plus grandes, il persiste une inhibition de la fluorescence dépendant de la concentration; dans ce cas, un dosage précis selon cette technique serait impossible.

Ces inconvénients sont évités dans la technique suivante que nous avons mise au point, et utilisée couramment pour le 3-4 benzopyrène.

Au lieu de comparer, en fluorescence, la solution à doser, à une solution étalon de 3-4 benzopyrène pur, on compare la solution à doser à cette même solution dans laquelle on ajoute une certaine quantité connue de 3-4 benzopyrène pur (surcharge). Le 3-4 benzopyrène qui se trouve dans la solution surchargée subira alors, de la part des substances étrangères, les mêmes influences que le 3-4 benzopyrène qui se trouve dans la solution non surchargée. Il n'y a aucune raison "à priori" pour que ces influences n'aient pas le même effet sur la fluorescence du 3-4 benzopyrène dans les deux solutions, c'est-à-dire que le pic de dosage n'émerge pas d'une hauteur proportionnelle à la concentration en 3-4 benzopyrène (si l'on se place dans un domaine de concentrations où cette proportionnalité est vérifiée pour les solutions de 3-4 benzopyrène pur). De toute façon, le succès du dosage par surcharge dans de nombreux cas montre qu'on peut l'admettre. La relation de proportionnalité précédente peut d'ailleurs être vérifiée à chaque dosage, pour le 3-4 benzopyrène ajouté, en préparant plusieurs solutions surchargées avec des quantités différentes de 3-4 benzopyrène.

Ici encore, il faut utiliser des solutions assez diluées, mais

cette condition est moins stricte que précédemment, puisqu'il suffit que la concentration de la solution à doser en 3-4 benzopyrène soit dans le domaine des concentrations où l'intensité de fluorescence d'une solution de 3-4 benzopyrène pur est proportionnel à la concentration (c < 1 γ/cm3).

Le procédé de dosage est donc le suivant, en prenant toujours comme exemple le 3-4 benzopyrène : comme en absorption, on mesure l'émergence des pics de dosage au-dessus de la fluorescence de fond. On compare :

- la hauteur ho du pic du 3-4 benzopyrène à 4036 A (dans le cyclohexane contenant 10% de benzène) au-dessus de la droite joignant les points à 4000 A et 4070 A (pieds de la bande) pour la solution à doser.

- la hauteur hl du même pic pour la solution ayant reçu une surcharge s de 3-4 benzopyrène par cm3.

Si la fluorescence du 3-4 benzopyrène est proportionnelle à la concentration (concentration < 1 γ/cm3) il vient :

$$\frac{hl}{ho} = \frac{x + s}{x}$$

d'où

$$x = \frac{s.\ ho}{hl - ho}$$

Un procédé plus précis et qui permet de vérifier simplement que, dans les conditions de l'expérience, la hauteur du pic est proportionnelle à la concentration pour le 3-4 benzopyrène ajouté et d'obtenir sans calculs la valeur de x est la suivante ;

Au lieu d'une solution surchargée, on en prépare plusieurs avec des surcharges dans les rapports 1- 2 - 5, par exemple. On porte sur un graphique en fonction de la surcharge s, les hauteurs h (ho, hl, h2, h3) des pics des différentes solutions. Si h est bien proportionnel à la concentration, on doit obtenir une droite d'équation

$$h = k\ (x + s)$$

k étant un facteur constant.

Si h = 0, x = -s. Donc la valeur absolue de l'abscisse de l'intersection de cette droite avec l'axe des surcharges est égale à x (figure 36).

Si les points obtenus s'alignent, aux erreurs de mesure près, c'est que la condition de proportionnalité est bien vérifiée pour le benzopyrène ajouté. On trace donc la droite donnant le minimum d'erreurs relatives pour les 4 points et on mesure la valeur absolue de l'abcisse $\overline{O\ A}$ de l'intersection de cette droite avec l'axe des surcharges.

Nous avons déterminé la précision de cette technique en ajoutant à un mélange exempt de 3-4 benzopyrène (goudron dont on avait enlevé par chromatographie le 3-4 benzopyrène qu'il contenait) 1/10 γ par cm3 de 3-4 benzopyrène. Le résultat du dosage a été 1,01/10 γ par cm3.

Dans la pratique, si on est amené à faire une série de dosages par fluorescence, au sein de mélanges complexes très voisins, il ne serait peut-être pas nécessaire d'utiliser ces techniques à chaque dosage. Une fois déterminée la dilution à laquelle un dosage par comparaison donne de bons résultats, on pourrait utiliser cette dilution d'une façon systématique, avec un risque d'erreur assez minime. Cependant les techniques que nous avons exposées sont celles qui donnent le maximum de garanties.

Jusqu'ici, nous avons exposé dans ce chapitre, soit des techniques déjà connues, soit des techniques dont les bases avaient été indiquées et que nous avons systématisées et adaptées à notre cas particulier du dosage des hydrocarbures.

Nous exposerons maintenant une technique plus particulière de détection et de dosage par fluorescence, qui permet, en opérant à basse température (-190°C) de caractériser et de doser le 3-4 benzopyrène avec

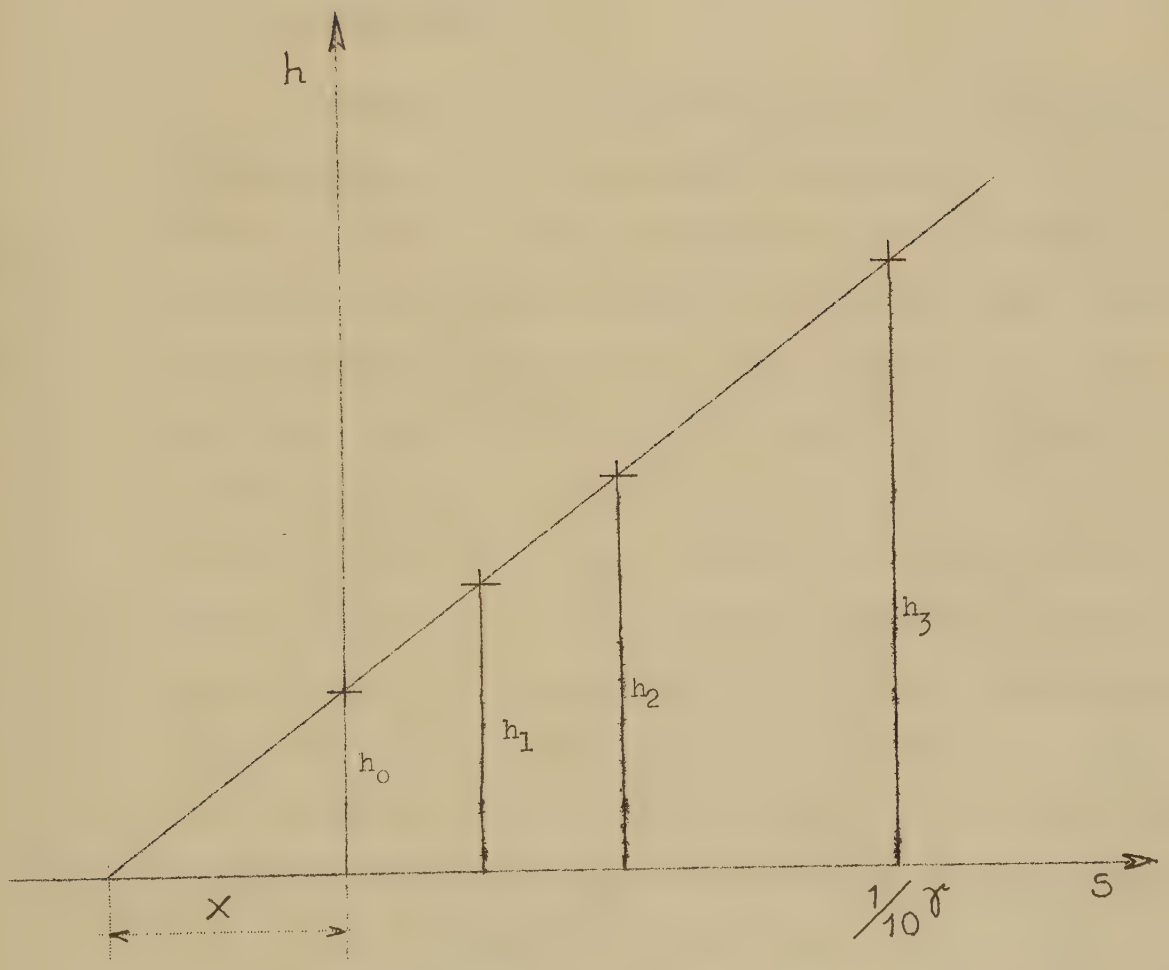


Figure 36

Dosage par surcharge : hauteurs des pics h en fonction de la surcharge s, mesure de la quantité x de 3-4 benzopyrène contenue dans l'échantillon non surchargé.

une plus grande spécificité ainsi qu'une sélectivité et une sensibilité accrues, qualités qui ont un grand intérêt pratique, ainsi que nous l'avons signalé dans cette introduction.

I - SPECTRES DE FLUORESCENCE DE SOLUTIONS CONGELEES A -190°C

A/ - 3-4 BENZOPYRENE

CHPOLSKII a montré qu'à basse température (-190°C) le spectre de fluorescence de solutions de 3-4 benzopyrène se résoud en bandes fines (43) et que lorsque les solvants sont des hydrocarbures paraffiniques normaux, cette résolution est particulièrement nette. Le n-octane semble donner les meilleurs résultats à ce point de vue. Dans ce solvant, le 3-4 benzopyrène donne plus de 40 bandes fines. CHPOLSKII a étudié ce spectre et a proposé une explication de l'emplacement de la plupart des bandes par rapport à une bande intense et de courte longueur d'onde (4030 A) qu'il a attribuée à la transition électronique pure $S_1 \rightarrow S_o$, en tenant compte des niveaux de vibration du 3-4 benzopyrène isolé ou en interaction avec les molécules de solvant. DIKOUN (18) a enregistré aussi un spectre qui concorde assez bien avec celui publié par CHPOLSKII. Ce phénomène semblait particulièrement intéressant pour la détection de ce produit; la finesse des bandes devait pouvoir permettre des identifications très sûres et des détections de très petites doses de 3-4 benzopyrène en présence de corps étrangers.

Après quelques essais encourageants de détection du 3-4 benzopyrène par cette méthode, il nous a semblé utile de reprendre l'étude

de CHPOLSKII et DIKOUN avec des échantillons de benzopyrène très purs, afin d'être certain que toutes les bandes enregistrées appartiennent au benzopyrène.

D'autre part, pour que nos résultats soient certainement reproductibles par d'autres auteurs, il fallait s'assurer que l'octane que nous utilisions comme solvant ne contenait pas d'impuretés ayant une influence sur le spectre de la solution.

1° - Purification du 3-4 benzopyrène

6 mg de 3-4 benzopyrène de la Compagnie "Eastman Kodak" ont été purifiés selon la technique n° 1, décrite au chapitre II. On obtient environ 1 mg de 3-4 benzopyrène cristallin exempt des impuretés donnant des bandes de phosphorescence entre 5000 et 6000 A.

2° - Synthèse d'octane et comparaison avec l'octane commercial

Deux échantillons d'octane ont été préparés :

- Echantillon "synthétique" : On a synthétisé 50cm^3 d'octane par la méthode de Clémensen : réduction de la méthyl-hexyl-cétone. Cet octane était distillé sur une colonne de 50 cm de haut et passé sur une colonne d'alumine.
- Echantillon "commercial" : 1 litre d'octane de la Compagnie "Eastman Kodak" a été distillé sur grande colonne; conservé la fraction centrale, qui a été passée ensuite sur alumine.

La chromatographie en phase gazeuse de ces deux échantillons (x) a révélé que l'échantillon "commercial" contenait trois impuretés a, b, c, et que l'échantillon "synthétique" ne contenait aucune quantité décelable de a, mais une impureté b' pouvant être identique à b, mais en quantité 10 fois moins grande et une impureté c' pouvant être identique à c, mais en quantité 12 fois plus grande. Donc, si l'une des impuretés avait une

(x) Nous remercions Monsieur CUZIN et ses collaborateurs qui ont effectué ces chromatographies.

influence sur le spectre, les différences devraient apparaître entre les spectres du 3-4 benzopyrène en solution dans ces deux solvants.

3° - Le spectre de fluorescence

Le spectre de fluorescence (fig. 37, courbes A1, A2, A3) du benzopyrène Eastman Kodak en solution à 1 γ /cm3 dans l'octane "commercial" à -190°C était identique, aux erreurs de mesures près, à celui du 3-4 benzopyrène purifié en solution dans l'octane "synthétique" sauf dans certaines régions basses du spectre. Dans ces régions, on constatait, pour les produits non commercieaux, un léger relèvement des ordonnées, attribué à des impuretés apportées par les chromatographies.

Les écarts sur la longueur d'onde des bandes correspondantes étaient inférieurs à 4 A dans la région spectrale 4000 - 4600 A et inférieurs à 8 A dans la région 4600 - 4900 A.

47 des 50 bandes enregistrées par CHPOLSKII ont été retrouvées.

Les écarts en longueur d'onde entre nos mesures et les siennes sont inférieurs à 4 A dans la région 4000 - 4400 A et à 7 A dans la région 4400 - 4600 A. Notre spectre se poursuit vers le rouge par 10 bandes assez larges qui n'ont été signalées ni par CHPOLSKII ni par DIKOUN. De même, quelques bandes supplémentaires, dont deux observées aussi par DIKOUN, s'intercalent entre les bandes données par CHPOLSKII. Le tableau III donne une comparaison des trois spectres.

Pour le calcul des spectres en unités énergétiques, nous nous trouvons ici dans le cas, signalé au chapitre II, des spectres intermédiaires entre les spectres de raies et les spectres continus et où il n'est pas possible de représenter les rapports entre les intensités des différentes bandes avec une unité qui ne dépende pas de l'appareil utilisé.

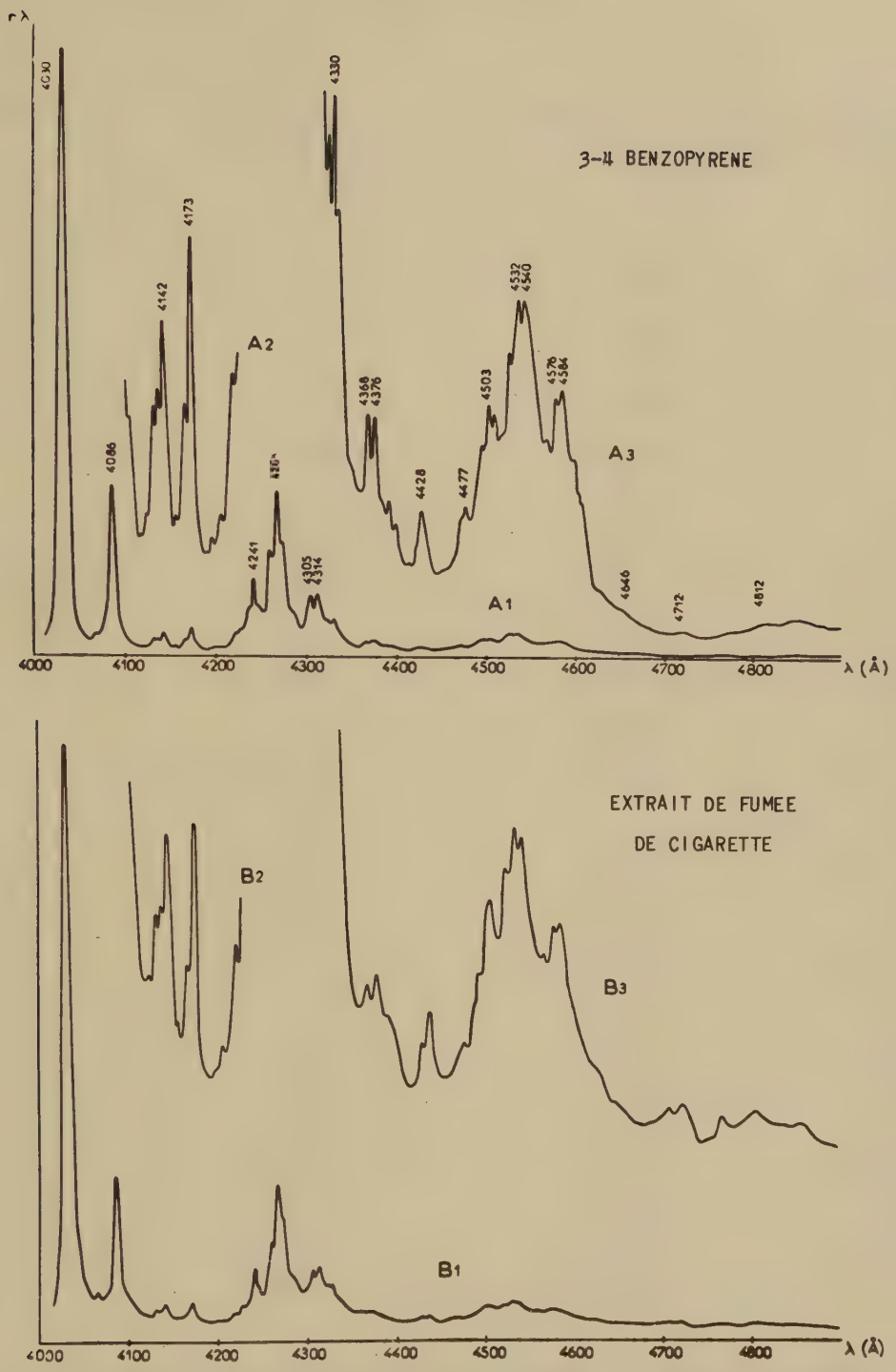


Figure 37 : Spectres de fluorescence à -190°C de solutions dans l'octane.

Courbes A : 3-4 benzopyrène 1γ/cm³. Les ordonnées des courbes A 2 et A 3 sont multipliées par 15 par rapport à celles de la courbe A 1.

Courbes B : Extrait de fumée de cigarette, obtenu par traitement chimique et chromatographique. Les ordonnées des courbes B 2 et B 3 sont multipliées par 13 par rapport à celles de la courbe B 1.

En ordonnée : les flux d'énergie émis par l'échantillon dans les bandes spectrales isolées par le monochromateur, pour un enregistrement à fentes constantes.

TABLEAU III (*)

DIKOUN	CHPOLSKII	Présent travail	Cigarette
	3 971,3		
	3 992,4		
4 025,7			
4 027,4			
4 030,5	4 029,9	4 030,1	4 030,3
4 032,7			
4 066,5	4 065,9	4 066,3	4 065,6
4 077,8			
4 085,2	4 085,3	4 085,9	4 085,7
4 087,7			
	4 105,6	4 106,0	
		4 117,8	
	4 123,1	4 124,5	4 123,0
	4 132,1	4 132,3	4 132,0
4 136,6	4 136,3	4 136,7	4 136,1
	4 141,7	4 142,0	4 141,1
	4 157,3	4 157,1	4 155,2
	4 166,1	4 167,1	4 166,4
	4 173,3	4 173,1	4 172,5
	4 190,2	4 189,6	
	4 196,2	4 195,6	4 194,7
	4 206,1	4 205,2	4 203,8
	4 2I4,0		
4 2I8,8	4 219,4	4 219,0	4 218,9
4 228,1	4 228,5	4 227,5	4 226,0
4 237,2	4 238,0	4 237,6	
4 241,5	4 242,7	4 241,4	4 241,1
4 247,4	4 250,8	4 247,0	4 244,2
4 260,6	4 261,1	4 259,5	4 259,3
4 263,1		4 262,5	
4 268,1	4 268,8	4 267,6	4 266,4
4 275,1	4 274,7	4 273,7	4 271,4
4 288,4	4 290,4	4 288,8	
	4 305,5	4 305,3	4 304,7
4 314,0	4 313,9	4 313,6	4 312,8
4 323,5		4 323,4	4 322,9
4 330,3	4 330,5	4 329,7	4 328,0
	4 337,0	4 335,1	

..../

(*) Les longueurs d'ondes soulignées sont inscrites sur la figure 37

TABLEAU III (suite)

DIKOUN	CHPOLSKII	Présent travail	Cigarette
	4 352,7	4 351,2	
	4 368,5	4 367,6	4 365,3
	4 377,8	4 376,0	4 375,4
	4 388,0	4 385	
	4 391,3	4 391	4 389
	4 400,6	4 399	
		4 4I4	
	4 422,6	4 421	4 426
	4 430,1	4 428	4 435
		4 471	
	4 475,2	4 477	4 473
	4 489,3	4 490	
	4 492,9	4 495	4 489
	4 498,8	4 499	
	4 507,3	4 503	4 503
	4 513,6	4 507	
		4 516	
	4 528,6	4 525	4 519
	4 537,7	4 532	4 529
	4 544,3	4 540	4 536
	4 566,9	4 567	4 562
	4 578,8	4 576	4 573
	4 586,8	4 584	4 580
		4 597	
		4 601	
		4 605	
		4 629	
		4 646	
		4 712	
		4 770	
		4 812	
		4 847	
		4 894	

les longueurs d'ondes soulignées sont inscrites sur la figure 37

On a tenu compte, cependant, de l'absorption sélective du monochromateur et de la courbe de sensibilité à énergies égales du photomultiplicateur.

La quantité représentée en ordonnée pour chaque courbe de la figure 1 est proportionnelle à :

$$r_\lambda = \frac{R_\lambda}{\sigma_\lambda \; T_\lambda}$$

R_λ = réponse du galvanomètre à fentes constantes

σ_λ = sensibilité monochromatique à énergies égales du récepteur

T_λ = transmission monochromatique du monochromateur.

r_λ représente, à un facteur près, les flux émis par l'échantillon dans la bande spectrale isolée par le monochromateur pour un enregistrement à fente constante. Pour en déduire la répartition spectrale des flux d'énergie dans les régions où le spectre peut être considéré comme continu, il faut diviser ces flux par les largeurs de bandes isolées par le monochromateur.

Voici ces largeurs de bandes en Angström "à mi-hauteur". Ces données permettent d'autre part de se rendre compte dans quelle mesure sont séparées les bandes consécutives.

courbes de la figure 1	4000	4100	4200	4400	4600	4800
A1 et B1	0,9	1,1	1,2	1,5	1,7	1,9
A2, B2 et B3	2,1	2,4	2,7	3,3	3,8	4,3
A3	1,2	1,4	1,6	1,9	2,2	2,6

B/ - AUTRES SUBSTANCES

1° - Solutions étendues (de l'ordre de 1 γ /cm3)

Ces substances, étudiées à basse température, ont donné des spectres de fluorescence moins bien résolus que celui du 3-4 benzopyrène. Cependant, on a observé à cette température pour certaines d'entre elles, un affinement des bandes qui n'est pas négligeable. Les longueurs d'ondes des bandes sont reportées sur le tableau IV, et les courbes spectrales d'énergie de la fluorescence du chrysène et du 1-2 benzanthracène sont représentées sur les figures 38 et 39. Les spectres du phénanthrène, du

TABLEAU IV (+)

Bandes de fluorescence à -190°C, dans l'ultraviolet le visible, de solutions diluées. Longueurs d'ondes en A.

Phénanthrène 6 γ/cm3	P.D.A. (x) 6 γ/cm3	Chrysène 1 γ/cm3	1-2 benzanthracène 1 γ/cm3	3-4-8-9 dibenzopyrène 1 γ/cm3	3-4-9-10 dibenzopyrène ∼ 1 γ/cm3
Excitation 3100 A	Excitation 3100 A	Excitation 3100 A	Excitation 3100 A	Excitation 3650 A	Excitation 3650 A
1/2 éther(xx) 1/2 hexnne normal	1/2 éther(xx) 1/2 hexane normal	1/2 acét.éthyle (xx) 1/2 n-pentane.		alcool	octane
3460	3605	3618	3844	4508	4316
3510		3652	(3885)	4565	4371
3565		3695	(3925)	4623	4406
(3585)		3723	(3950)	4797	4421
3640	3785	3807	(3990)	4860	4437
3740		(3850)	4066	(4923)	4463
3825	3990	3930	4095	5125	4543
4040	4250	(3980)	4320	5170	4589
4255		4018	4600		4639
		(4075)			4703
		(4100)			4725
		(4150)			4761
		4250			4821
					4908
					4963

(+) Les longueurs d'ondes soulignées sont celles des principaux pics, les longueurs d'ondes entre parenthèses sont celles d'épaulements.

(x) Voir la note de la page 81

(xx) L'éther ou l'acétate d'éthyle ont été ajoutés pour la comparaison de ces spectres avec ceux des métabolites que nous avons étudiés dans la peau de souris, et qui sont libérés de leur combinaison avec les protéines sous la forme d'hydrazides d'acides aromatiques. Ces corps sont très peu solubles dans les solvants peu polaires tels que les paraffines normales, mais sont solubles dans l'éther et l'acétate d'éthyle.

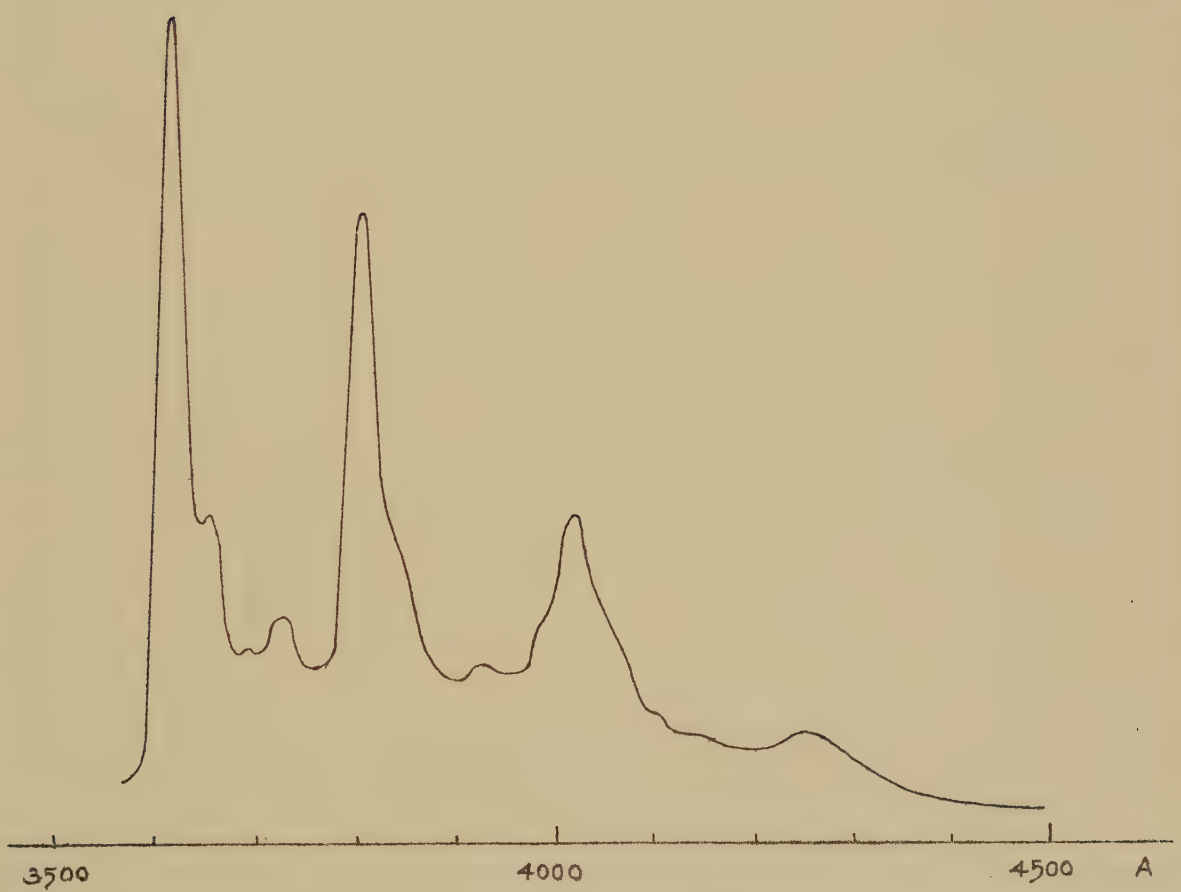


Figure 38

Courbe spectrale d'énergie de la fluorescence à -190°C d'une solution d'environ 1 γ de chrysène par cm3 d'un mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et de n-pentane.

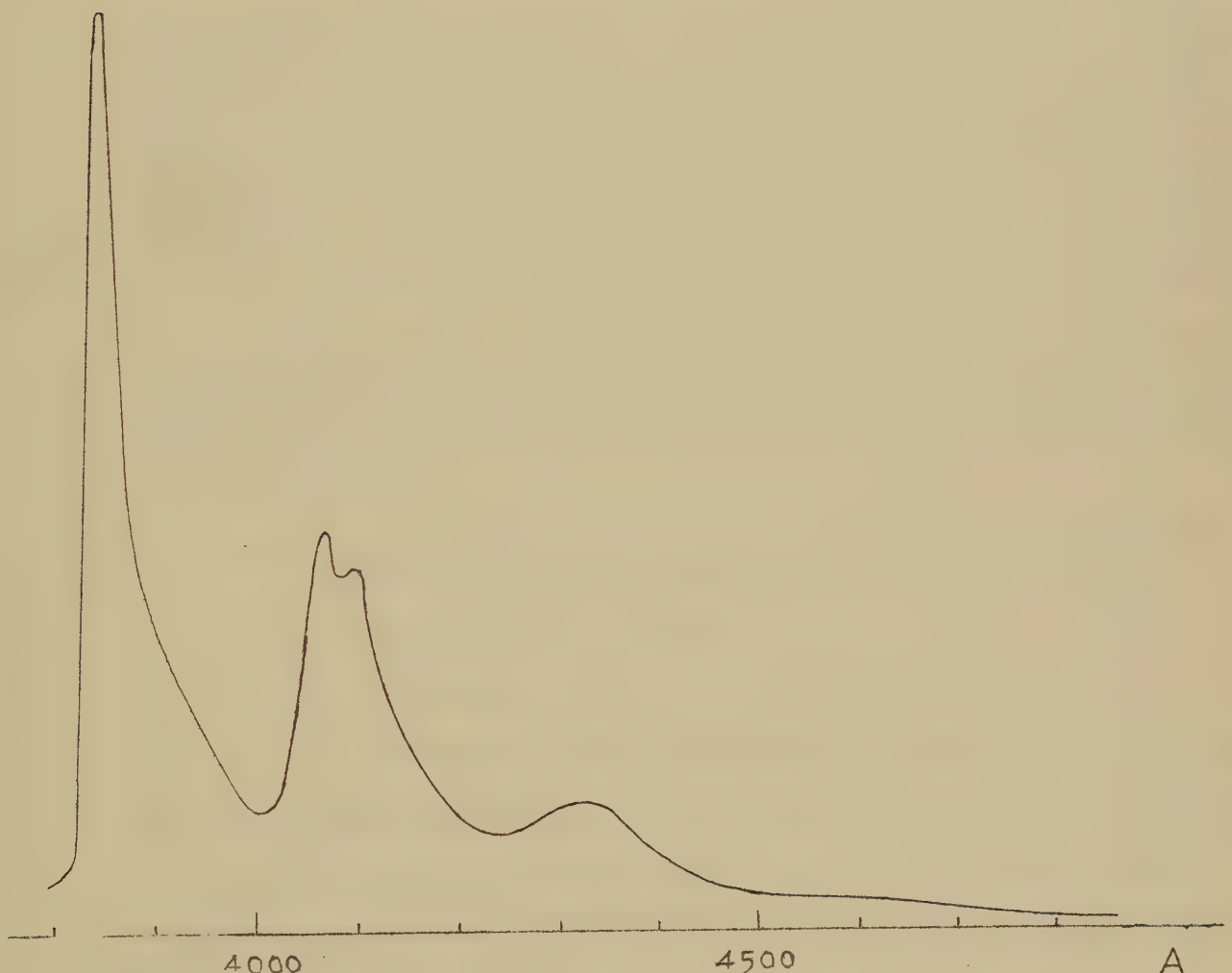


Figure 39

Courbe spectrale d'énergie de la fluorescence à -190°C d'une solution de 1 γ de 1-2 benzanthracene par cm3 d'un mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et de n-pentane.

P.D.A. (+), du chrysène et du 1-2 benzanthracène ont été étudiés surtout en vue de leur détection dans les tissus animaux mis en contact avec des hydrocarbures cancérigènes tels que le 3-4 benzopyrène ou le 1-2-5-6 dibenzanthracène. En effet, on avait certaines raisons de supposer que des corps ayant le squelette carboné du 1-2 benzanthracène, du chrysène ou du phénanthrène pourraient apparaître au cours du métabolisme des hydrocarbures précédents (13) (14) (50).

Il convient de signaler ici, que pour l'étude des spectres de fluorescence pour lesquels une excitation à des longueurs d'ondes inférieures à 3000 A est nécessaire (par exemple pour l'étude du spectre de fluorescence du naphtalène), certains solvants ne peuvent convenir en raison de leur sensibilité à ces radiations. On observe par exemple avec l'acétate d'éthyle commercial redistillé l'apparition d'un certain nombre de bandes de fluorescence dans l'ultraviolet au cours de l'enregistrement du spectre de ce solvant pur. L'octane commercial donne par irradiation une série de bandes assez fines entre 4500 et 5000 A. De l'octane synthétisé par nous même, selon la méthode de Clemensen, donne le même phénomène.

D'autre part, certaines des substances étudiées sont assez photosensibles même avec une excitation à 3100 A. En particulier le spectre du phénanthrène doit être enregistré très rapidement pour éviter une trop grande diminution de l'intensité du rayonnement de fluorescence au cours de l'enregistrement.

2° - Solutions concentrées dans le toluène. (de l'ordre de 100 γ/cm3)

Deux faits sont à signaler :

a) Influence du mode de congélation du solvant.

Ainsi que cela a été signalé au chapitre III, on a pu montrer que le toluène semble se congeler sous trois formes différentes. Les spectres de fluorescence par exemple d'une solution d'anthanthrène, à la concentration de 100 γ/cm3, sont très différents suivant les conditions de congélation (figure 40). On a pu distinguer par observation visuelle directe des échantillons soumis à l'éclairement d'une lampe à vapeur de mercure dont le rayonnement était filtré par un verre "Ultraviol", trois formes de congélation distinctes:

(+) voir note p. 81

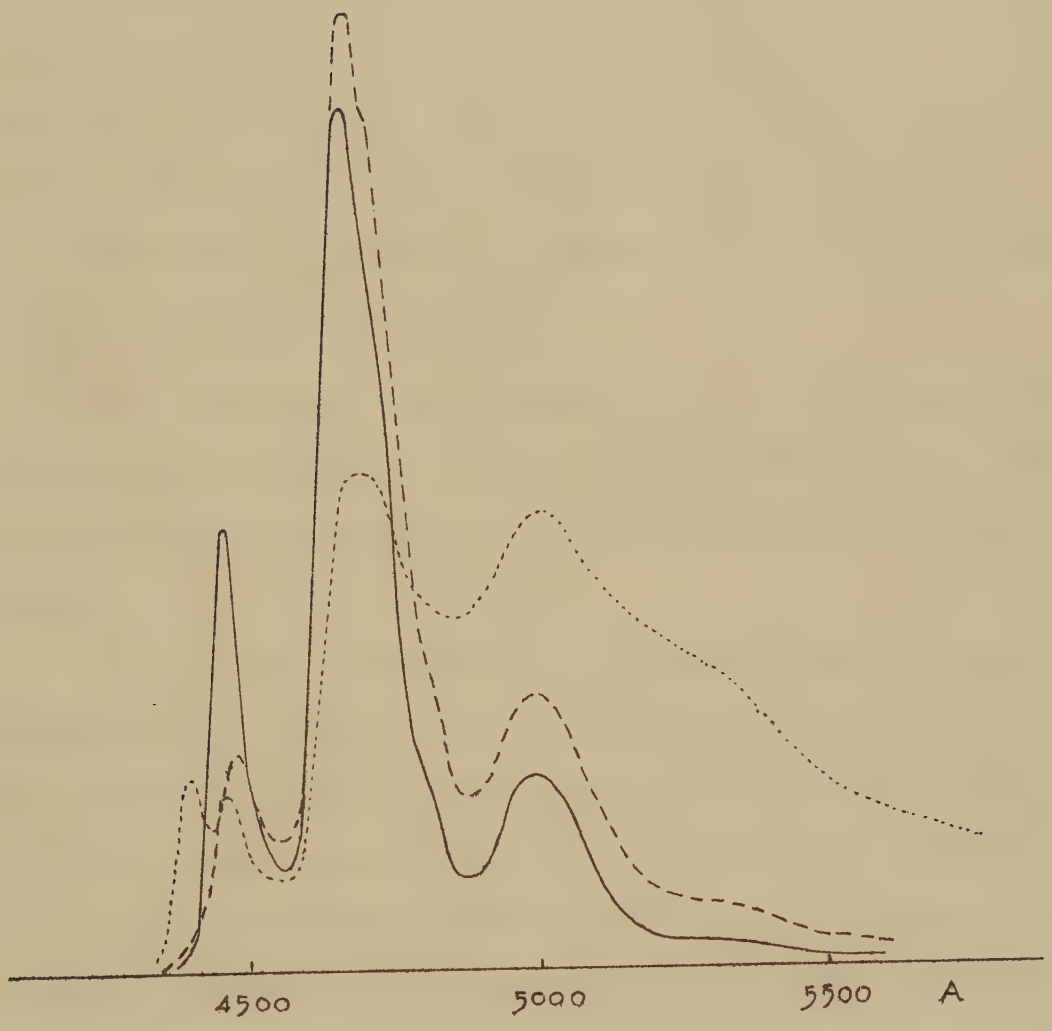
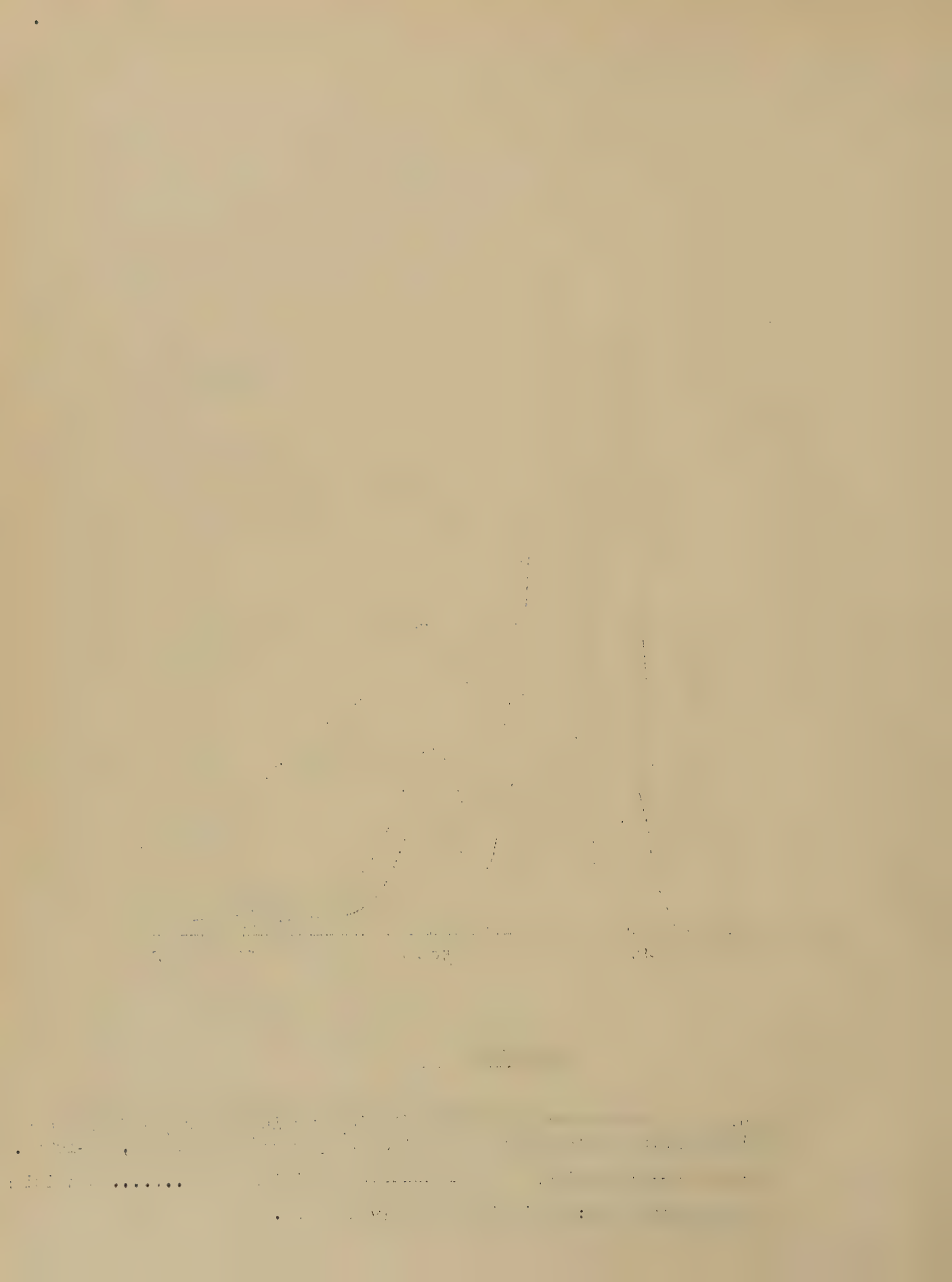


Figure 40

Influence des conditions de congélation sur le spectre de fluorescence d'une solution d'anthanthrène à 100 γ par cm3 de toluène, à -190°C.

———— conditions (a) --------- conditions (b) ..... conditions (c)

en ordonnée : Deviations du galvanomètre.



(a) Congélation très rapide dépôt de la solution dans une coupelle de cuivre portée à la température de l'azote liquide : on obtient un verre de fluorescence bleue.

(b) Réchauffement partiel de cet échantillon à une température proche de la température de fusion du toluène, c'est à dire vers -100°C : le verre se transforme en une masse microcristalline de fluorescence bleue qui conserve le même aspect lorsqu'elle est refroidie à nouveau vers -190°C.

(c) Réchauffements partiels et refroidissements successifs : on obtient des cristaux de fluorescence jaune.

Si l'on répète un grand nombre de fois ces réchauffements et refroidissements, la fluorescence de l'échantillon finit par devenir rose, en raison de la précipitation de cristaux d'anthanthrène qui ont cette couleur en fluorescence.

Les spectres de fluorescences de ces trois formes sont assez différents (figure 40). Par exemple, la bande intense de plus courte longueur d'onde est à 4454 A pour la forme (a), à 4477 A pour la forme (b) et à 4397 A pour la forme (c). Les rapports des intensités des différentes bandes changent beaucoup d'un spectre à l'autre. Ces changements témoignent probablement de l'existence de plusieurs formes de congélation du toluène (verres et formes cristallines différentes) et d'interactions importantes entre le solvant et le soluté.

Il est difficile d'obtenir à volonté l'une ou l'autre des formes décrites et bien souvent on n'obtient qu'un mélange de plusieurs formes. Par exemple la forme (c) ne peut être obtenue exempte de la forme (b) et l'on voit très bien dans les échantillons que l'on a cherché à obtenir sous la forme (c) la juxtaposition de cristaux de fluorescence jaune et de fluorescence bleue.

b) Bandes très faibles de courtes longueurs d'ondes.

On enregistre dans beaucoup de cas à côté des bandes fortes situées à des longueurs d'ondes plus grandes que celles des bandes d'absorption, un certain nombre de bandes très faibles à des longueurs d'ondes plus courtes. Ces bandes sont dans la position de bandes anti-Stokes. A la bande à 4070 de l'anthanthrène semble correspondre la bande à 4090 du monométhylanthanthrène et la bande à 4160 du diméthylanthanthrène (mode de congélation (c) du toluène).

Mais les déplacements bathochromes dûs à la méthylation ne sont pas les mêmes pour ces bandes que pour les bandes d'absorption ou de fluorescence de forte intensité. D'autre part, il ne semble pas que ces bandes aient tendance à augmenter avec la température par rapport aux autres bandes, bien que cette étude de l'effet de la température soit compliquée par l'existence de plusieurs formes de congélation du toluène pour lesquelles ces bandes de courtes longueurs d'ondes sont d'intensités très différentes. On peut cependant constater qu'à la température du laboratoire ces bandes de courtes longueurs d'ondes ont été trouvées moins fortes, par rapport aux bandes de plus grandes longueurs d'ondes, que dans certains des échantillons à basse température. Il semble donc que ces bandes ne sont pas des bandes anti-Stokes, mais plus probablement des bandes d'impuretés.

L'illusion de l'effet bathochrome dû à la méthylation pourrait être dû à ce que les produits méthylés sont préparés à partir de l'hydrocarbure fondamental par une série de réactions qui peuvent à la fois méthyler l'hydrocarbure et les impuretés qu'il contient. Ces impuretés peuvent donc se retrouver sous la forme méthylée avec l'hydrocarbure méthylé.

II - DETECTION DES HYDROCARBURES A L'AIDE DE LEUR SPECTRE DE FLUORESCENCE A BASSE TEMPERATURE

A/- 3-4 BENZOPYRENE

Ainsi qu'on pouvait s'y attendre d'après l'étude des spectres, les qualités de spécificité, sélectivité et sensibilité de la détection du 3-4 benzopyrène par fluorescence sont considérablement améliorées si l'on refroidit à -190°C les solutions, dans un hydrocarbure paraffinique normal, les échantillons à analyser (43)(18) (+).

1° - Technique de caractérisation

L'octane a été choisi comme solvant parce qu'il donne des solutions de 3-4 benzopyrène qui présentent, à basse température, des bandes particulièrement fines.

Pour une caractérisation soigneuse, les solutions à analyser sont évaporées à sec sous vide et le résidu repris par de l'octane exempt de 3-4 benzopyrène; le spectre complet de cette solution est alors enregistré et comparé à celui du 3-4 benzopyrène pur.

Dans le cas de simples détections, il suffit le plus souvent d'ajouter de l'octane dans la solution à analyser. Par exemple, on constate que pour les éluats de chromatographies contenant du 3-4 benzopyrène, en solution dans des mélanges de benzène et de cyclohexane, une addition de 10% d'octane suffit à faire apparaître le spectre du 3-4 benzopyrène presque aussi nettement que par évaporation et reprise dans de l'octane pur (figure 41, courbes 3 et 4).

Bien souvent, on peut se contenter d'enregistrer la bande la plus intense du benzopyrène, par exemple lorsqu'il s'agit de vérifier qu'un solvant ne contient plus ou très peu de 3-4 benzopyrène, ou pour la localisation des fractions d'éluats qui contiennent du 3-4 benzopyrène, au cours d'une chromatographie.

(+) Des auteurs soviétiques (18) ont utilisé cette technique pour détecter le 3-4 benzopyrène dans certains produits de consommation. Leurs résultats ont été publiés un an avant les nôtres, sans que nous en ayons eu alors connaissance. Nous décrirons néanmoins nos propres observations, parce qu'elles conduisent à l'élaboration de notre technique de dosage, qui, elle, a été publiée antérieurement à la technique proposée par DIKOUN (7R).

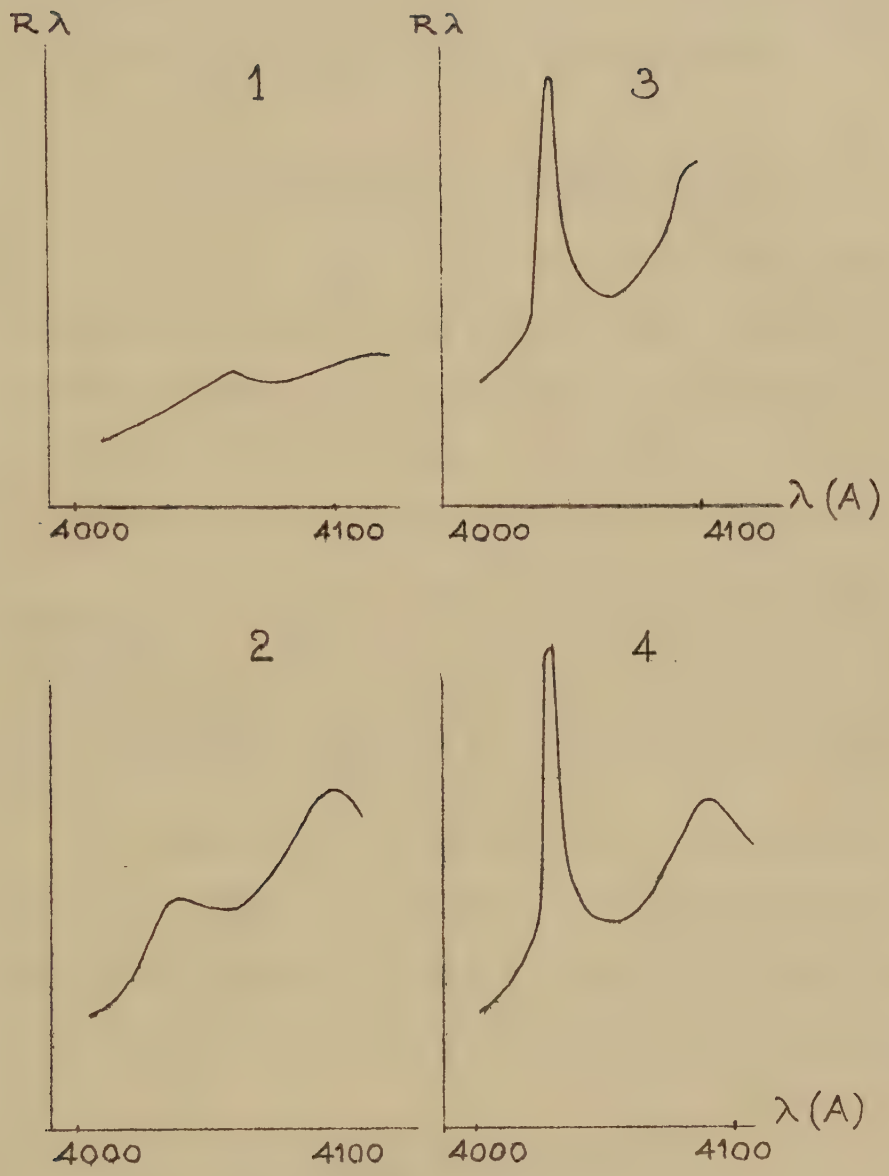


Figure 41

Spectres de fluorescence entre 4 000 et 4 100Å d'une fraction isolée par une chromatographie, de fumée de cigarette.

1 - solution dans un mélange de benzène, de cyclohexane et d'octane à la température du laboratoire
2 - solution dans le cyclohexane à -190°C
3 - solution dans un mélange de 90% de cyclohexane et de 10% d'octane à - 190°C
4 - solution dans l'octane pur à -190°C

En ordonnée : déviations du galvanomètre.

En prenant des exemples dans la pratique, nous montrerons maintenant les différents avantages de cette technique par rapport à la technique classique de fluorescence à basse température.

2° - Spécificité de la caractérisation.

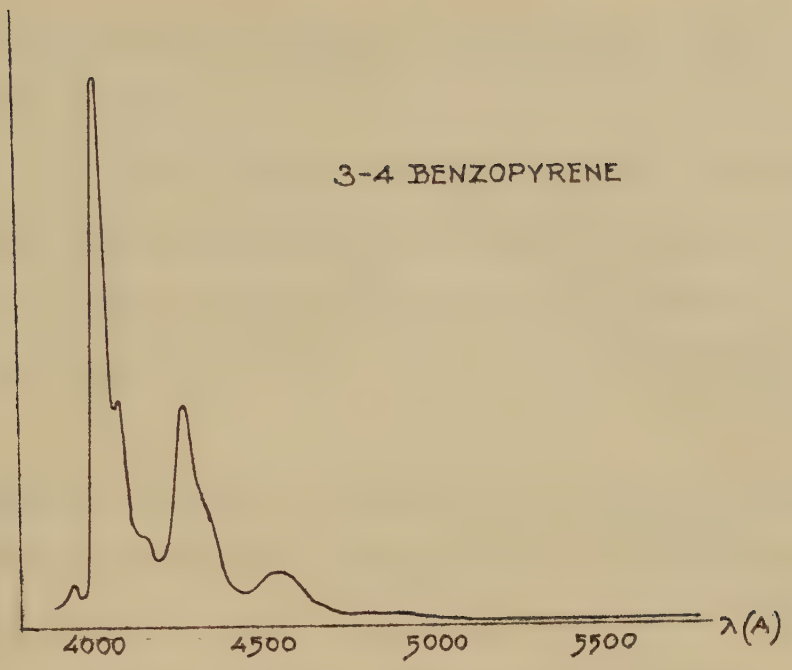
La finesse et le nombre des bandes permettent des identifications presque certaines. A titre d'exemple, la figure 37B représente, en dessous du spectre du 3-4 benzopyrène, le spectre de fluorescence à -190°C d'une solution dans l'octane d'une fraction obtenue à partir de fumée de cigarettes, après 8 chromatographies sur alumine silice et papier.

Les longueurs d'ondes des bandes de ce spectre, consignées dans le tableau III, coïncident avec celles du 3-4 benzopyrène à ± 4 A près, entre 4000 A et 4400 A et à ± 8 A près, entre 4400 A et 4600 A. Les rapports des intensités des bandes sont sensiblement les mêmes. Cependant un fond continu surélève l'ensemble du spectre et pour les longueurs d'ondes supérieures à 4400 A où les bandes du 3-4 benzopyrène sont plus diffuses, le spectre est perturbé.

En dépit de ces différences, la caractérisation est incontestable. A la température ordinaire la caractérisation est moins spécifique. La figure 42 permet de comparer le spectre de fluorescence à la température ordinaire de la même fraction, à celui du 3-4 benzopyrène.

3° - Sélectivité de la détection

Cette méthode de détection permet de déceler très nettement du 3-4 benzopyrène dans des mélanges où la proportion de cette substance est si petite que le spectre de fluorescence à la température ordinaire ne donne qu'une indication peu sûre ou même aucune indication sur sa présence. La figure 37 en donne un exemple. Cette sélectivité est précieuse pour choisir les échantillons contenant du 3-4 benzopyrène au début des



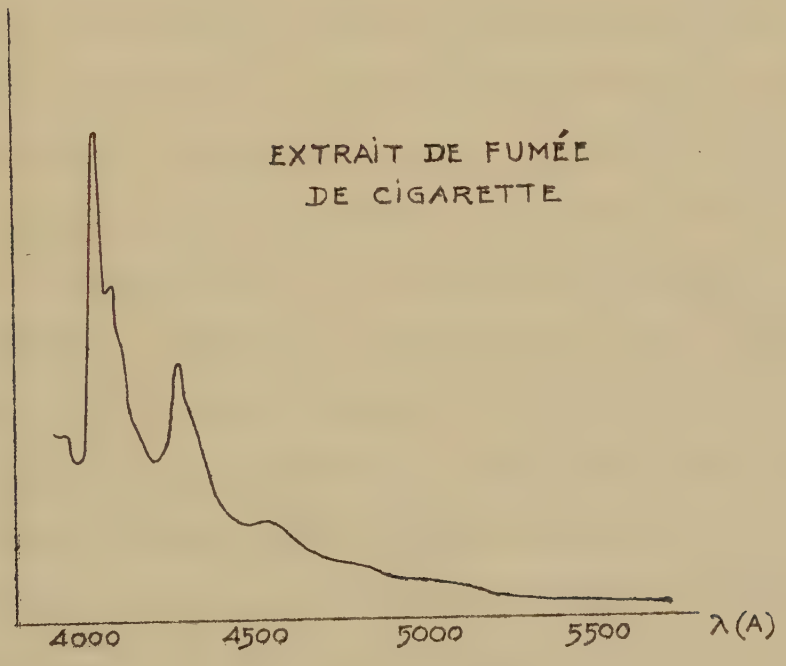


Figure 42

Spectres de fluorescence à la température du laboratoire de solutions dans des mélanges d'environ 70% de cyclohexane et 30% de benzène, de 3-4 benzopyrène à la concentration de 1 γ/cm3 et de l'extrait de fumée de cigarette dont le spectre est représenté à basse température sur la figure 37.

En ordonnée : flux d'énergie émis par unité de longueur d'onde.

fractionnements des mélanges très complexes et contenant très peu de cette substance.

Ainsi qu'on le verra dans un exemple ultérieur, le 3-4 benzopyrène est décelable par cette méthode en présence d'une quantité 20.000 fois plus grande d'une fraction de goudron qui contient probablement une grande proportion de corps fluorescents.

Remarque : On peut se demander quelles sont les raisons d'une spécificité aussi surprenante. Il se peut qu'elle ne soit pas entièrement attribuable à la finesse inhabituelle des bandes et au grand rendement de fluorescence. Un autre facteur peut intervenir, qui est la coïncidence de la principale longueur d'onde d'excitation avec la longueur d'onde d'un pic aigu du spectre d'absorption du 3-4 benzopyrène à basse température. Le fait que la bande d'absorption à 3645 A du benzopyrène en solution dans le cyclohexane à 20°C est presque en coïncidence avec les deux raies du mercure 3650-3655, dans lesquelles la majeure partie de l'énergie d'excitation est concentrée, est en faveur de cette interprétation. Il se peut d'ailleurs que la sélectivité soit augmentée si l'on excitait les échantillons dans la bande d'absorption du 3-4 benzopyrène située vers 3850 A, puisque la majorité des substances organiques absorbent plus dans l'ultraviolet lointain que dans l'ultraviolet proche. Pour cela, il faudrait adopter un dispositif analogue à celui mis au point par BOWMAN (79) où les échantillons sont excités par une radiation monochromatique isolée par un monochromateur. Cette technique, appliquée par SAWICKI (17) aux hydrocarbures aromatiques, a donné des résultats remarquables à la température ordinaire. Cependant, il serait difficile

avec cette technique d'obtenir une résolvance suffisante pour pouvoir profiter de l'avantage que fournit la finesse des bandes à basse température, puisqu'il serait nécessaire d'utiliser des fentes assez larges pour compenser la perte de flux lumineux occasionnée par le passage dans le monochromateur d'excitation. En effet, une expérience faite avec une solution de 3-4 benzopyrène dans l'hexane (x) à la température ordinaire, a montré qu'avec un appareil commercial de ce type (Aminco Bowman) on ne pouvait séparer toutes les bandes de fluorescence de la solution, même avec l'ouverture de fente maximale du monochromateur d'excitation.

4° - Sensibilité de la détection

10^{-4} γ de 3-4 benzopyrène par cm3 d'octane sont facilement détectés, et 10^{-5} γ par cm3 donnent encore un pic décelable à 4030 A. Cette sensibilité est telle qu'il est difficile d'obtenir de l'octane ne donnant pas la bande à 4030 A du 3-4 benzopyrène.

Des distillations répétées sur grande colonne ne suffisent pas; il faut faire passer ce solvant sur une colonne d'alumine; on repasse plusieurs fois de suite les premières fractions de liquide sur la colonne de façon à éliminer les traces du 3-4 benzopyrène contenues dans les récipients.

Pour la détection des plus petites concentrations (inférieures à 10^{-3} γ par cm3), de grandes précautions sont nécessaires pour éviter les contaminations accidentelles par des traces de 3-4 benzopyrène.

Les contaminations ne semblent pas venir principalement des retombées directes des poussières atmosphériques normales ; en effet, 1 cm3 d'octane abandonné 24 heures dans un bécher de 2 cm3 sans couvercle sur une paillasse du laboratoire, a donné un pic à 4030 A correspondant seulement à 5.10^{-5} γ . Cependant une poussière à peine visible ramassée sur une

(x) Expérience faite en collaboration avec les laboratoires de Monsieur le Professeur P. COURRIER que nous tenons à remercier ici.

paillasse et repérée en fluorescence comme pouvant être du 3-4 benzopyrène a donné un spectre de 3-4 benzopyrène correspondant à environ 1/10 de gamma. Les contaminations sembleraient donc être dûes, au moins en partie, à des traces de 3-4 benzopyrène cristallisé répandues sur les tables lors des manipulations précédentes ou les vêtements. Cependant, les courants d'air sont aussi à craindre, puisqu'ils peuvent soulever ces particules de 3-4 benzopyrène ainsi que les poussières atmosphériques qui auraient pu s'accumuler en certains points du laboratoire. Pour éviter ces contaminations, nous avons été amenés à prendre des précautions rappelant celles observées en bactériologie :

- Fenêtres du laboratoire fermées, et chaque fois que cela est possible, travail sous une hotte nettoyée avec soin intérieurement et dont les volets d'aspiration ont été fermés.

- Tapissage de la paillasse avec du papier filtre.

- Bouchage des tubes avec du papier d'aluminium.

- Lavage des mains avant chaque expérience.

- Protection des pipettes : seule la partie supérieure, ne pénétrant pas dans les tubes à essais, est touchée avec les mains, la partie inférieure est enveloppée dans du papier filtre, entre les utilisations.

- Vérification de toute la verrerie, avant chaque expérience, par rinçage à l'octane et examen de la fluorescence à -190°C de l'octane de lavage.

- Du papier d'aluminium est disposé sur les bouchons des bouteilles de solvants, de façon à éviter le dépôt de poussières sur les goulôts. Pour ne pas contaminer les stocks, on puise dans des petits flacons remplis périodiquement à partir des stocks.

Depuis que ces précautions ont été respectées, aucune contamination n'a plus été enregistré sur plus de 100 examens de solutions.

B/ - AUTRES SUBSTANCES

Comme nous l'avons signalé, les spectres des substances étudiées ne sont pas aussi bien résolus à basse température que celui du 3-4 benzopyrène. Il n'est donc pas étonnant que ces produits ne soient pas aussi aisément décelables par leur spectre de fluorescence à -190°C que le 3-4 benzopyrène.

Voici les quantités minimales détectées de cette façon pour un certain nombre d'hydrocarbures qui nous intéressaient. Nous indiquons ici les concentrations dans un solvant purifié qui donnent encore très nettement les trois ou quatre principales bandes du spectre.

Substance	Excitation	Solvant	Sensibilité
Chrysène	3100 A	Pentane	$0,5\ 10^{-2}$ γ/cm3
Phénanthrène	2300-3300 A	1/2 Hexane + 1/2 Ether	1 γ/cm3
P.D.A. (x)	2300-3300 A	1/2 Hexane + 1/2 Ether	1 γ/cm3
Naphtalène	2500 A	Hexane	2 γ/ cm3
Picène	3100	Acétate d'éthyle	$5\ 10^{-2}$ γ/cm3

On pourrait se demander pourquoi le phénanthrène et le naphtalène donnent des résultats médiocres, bien qu'ils aient, à la température ordinaire, un rendement de fluorescence élevé (80) et que leurs bandes de fluorescence soient aussi fines que celles du chrysène et du picène. Dans le cas du naphtalène, ceci est dû, en partie, à ce que cette substance n'est très absorbante qu'à des longueurs d'ondes assez courtes, auxquelles la brillance des lampes à vapeur de mercure à haute pression et à grande brillance est beaucoup plus faible qu'aux longueurs d'ondes plus grandes ; d'autre part, sa fluorescence est située à des longueurs d'ondes assez courtes, auxquelles le photomultiplicateur est moins sensible et la transmission du monochromateur plus faible qu'aux longueurs d'ondes plus grandes. Donc, aux faibles concentrations, on est obligé d'agrandir les fentes du monochromateur pour obtenir un flux suffisant sur le photo-multiplicateur; ceci augmente plus les flux mesurés pour le spectre continu dû aux impuretés du solvant que ceux mesurés aux sommets des bandes de fluorescence de la substance de la substance à détecter. Le contraste est donc diminué.

(x) Voir la note de la page 81

Cependant, il y à une autre raison, qui est peut-être la plus importante, et qui rendrait compte de la faible sensibilité observée avec le phénanthrène et le P.D.A., c'est que la concentration des solvants en impuretés fluorescentes de petit poids moléculaire doit être plus élevée que la concentration en impuretés plus lourdes. En effet, l'entraînement par distillation des petites molécules est probablement plus important ; d'autre part, l'alumine retient mieux, en général, les substances de gros poids moléculaire. Or, les petites molécules sont en général fluorescentes à des longueurs d'ondes plus courtes que les grosses. Donc les solvants purifiés utilisés pour la détection doivent émettre un rayonnement de fluorescence de flux plus élevé, avec des excitations de courtes longueurs d'ondes qu'avec des excitations de grandes longueurs d'ondes, à flux excitateurs égaux. Il en résulte que le spectre de fluorescence d'une substance fluorescente dans le proche ultraviolet ou dans le visible sera moins perturbé par la fluorescence du solvant que celui d'une substance fluorescente dans l'ultraviolet lointain. Ceci est confirmé par le fait que la sensibilité est limitée, pour ces dernières substances, plus par la fluorescence de fond que par le manque de sensibilité du spectrophotomètre. Pour améliorer la sensibilité dans le cas de ces substances, il faudrait donc surtout chercher à obtenir des solvants exempts de molécules fluorescentes dans l'ultraviolet lointain. Cependant, il se peut que l'amélioration en sensibilité absolue, qui serait obtenue de cette façon, n'améliore guère la sensibilité, en présence de substances étrangères, puisque la plupart des substances organiques absorbent dans l'ultraviolet lointain et qu'il doit y avoir un plus grand nombre de substances fluorescentes dans l'ultraviolet lointain que dans le visible et l'ultraviolet proche.

Il conviendrait aussi, pour expliquer les résultats, de tenir compte de l'influence de l'oxygène dissous dans les solutions, qui peut avoir un effet inhibiteur important sur la fluorescence de ces composés (80), ainsi que du changement du rendement de fluorescence des solutions par congélation. On doit signaler par exemple, que le rendement de fluorescence d'une solution alcoolique d'anthanthrène diminue fortement quand elle est congelée.

Pour les composés du tableau précédent, la phosphorescence donne de meilleurs résultats, peut-être parce que c'est une propriété moins répandue que la fluorescence.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus en fluorescnec avec ces substances sont un peu décevants si on les compare à ceux obtenus avec le 3-4 benzopyrène.

III - DOSAGE DU 3-4 BENZOPYRENE PAR FLUORESCENCE A BASSE TEMPERATURE

Seul le 3-4 benzopyrène sera mentionné ici. La détection quantitative d'autres substances dont les spectres comportent des bandes fines à basse température n'a pas été essayée. Cependant, il n'y a aucune raison pour que la technique décrite ne leur soit pas applicable.

ILINA (81) a décrit une technique de détection semi-quantitative du 3-4 benzopyrène dans les goudrons, par fluorescence à basse température de solutions dans l'huile de paraffine. Il essayait de tenir compte des perturbations apportées par les substances étrangères, en comparant la fluorescence de l'échantillon à doser avec la fluorescence d'un goudron pauvre en 3-4 benzopyrène dans lequel il ajoutait une quantité connue de 3-4 benzopy-

rène. L'imprécision de cette méthode est probablement due aux différences entre la composition du goudron pauvre en 3-4 benzopyrène et celle du goudron à analyser ainsi qu'à des difficultés mentionnées dans le paragraphe suivant, inhérentes à l'utilisation d'échantillons congelés.

A/ - DIFFICULTES INHERENTES A L'UTILISATION DE SOLUTIONS CONGELEES

Les bons résultats qualitatifs obtenus incitaient à utiliser quantitativement la technique de détection par fluorescence à -190°C de solutions dans l'octane. Cependant cette tentative paraissait difficile puisqu'on constatait d'un échantillon congelé, à l'autre, pour une même solution, des variations assez importantes de la réponse de l'appareil de mesure. Ces variations peuvent dépasser 100%, si les échantillons sont congelés sans précautions particulières. Ceci n'est pas étonnant si on considère que l'octane forme un agglomérat de cristaux à la congélation et que l'on a affaire à des échantillons très inhomogènes. La seule grosseur des grains cristallins peut influer sur le flux lumineux pénétrant dans l'appareil; en effet, la lumière excitatrice subit des réflexions multiples sur les faces des microcristaux et le trajet optique de ce rayonnement dans la solution est augmenté par rapport à celui suivi dans un échantillon homogène, d'une façon qui dépend du nombre de réflexions donc de la grosseur des cristaux. Le nombre de molécules qui sont excitées, dans la région de l'échantillon vue de l'appareil, n'est donc pas reproductible. D'autre part, des petites cavités peuvent se former dans l'échantillon; ces cavités diminuent alors le flux atteignant l'échantillon. La diffusion du rayonnement de fluorescence par l'échantillon ainsi que les variations du contact thermique de l'échantillon avec la cuve et de la cuve avec le

support peuvent également intervenir. Des changements dans la forme cristalline de l'octane congelé, analogues à ceux qui ont été décrits pour le toluène, ne semblent pas avoir lieu avec l'octane, puisqu'on a toujours trouvé le même spectre de fluorescence du 3-4 benzopyrène dans ce solvant à -190°C. Il semble que les variations observées aient leur origine principale dans des changements des conditions géométriques ou de conditions qui affectent dans des proportions comparables les rendements de fluorescence de la plupart des composés organiques. En effet, bien que pour un mélange complexe on observe d'un échantillon à l'autre des variations importantes de la réponse de l'appareil à une longueur d'onde donnée, le spectre de fluorescence des divers échantillons change peu.

B/ - MOYENS DE PALLIER CES DIFFICULTES

1° - Procédés de congélation

Il convient d'abord d'adopter une technique de congélation bien définie qui donne des échantillons aussi réguliers que possible.

Avec la cuve de cuivre la principale difficulté est d'obtenir des échantillons bien collés à la cuve et de surface bien plane. Si on verse la solution lorsque la cuve a atteint la température de l'azote liquide, les échantillons sont mal ou pas du tout collés. Si on verse la solution lorsque la cuve est encore chaude le liquide a tendance à en sortir par capillarité. Pour obtenir un échantillon bien collé, il faut verser le liquide lorsque la cuve est juste à la température de congélation du solvant; on peut repérer cet instant en déposant une très petite goutte de solution dans le fond de la cuve au début du refroidissement de celle-ci, lorsqu'on voit la goutte se congeler on verse alors les 3/4 du volume de solution. La surface de l'échantillon ainsi obtenue, en général, n'est pas plane, un creux en forme de gouttière s'est formé au centre, on comble alors ce creux en versant en deux ou trois fois le reste de la solution. On obtient alors une surface à peu près plane.

Avec la cuve de quartz cylindrique la longueur de solution traversée par la lumière de fluorescence peut être un peu plus grande que dans le cas précédent, ce qui occasionne une diffusion et une réabsorption plus importante de ce rayonnement, d'autant plus que des cavités ont tendance

à se former en plus grand nombre dans la solution avec ce type de cuves. Cependant avec cette cuve la forme de la surface des échantillons est mieux reproductible. Pour la congélation, la cuve est mise en position dans le cryostat et on attend 5 minutes que la congélation ait eu lieu.

Avec ces deux types de cuves, en procédant comme il a été dit, les variations dans la réponse de l'appareil sont en moyenne de 20% et ne dépassent pas en général 50%.

Pour compenser ces variations, on peut utiliser l'un ou l'autre des procédés suivants :

2° - Répétition des mesures

On prépare plusieurs échantillons congelés de la solution à étudier et on fait la moyenne des mesures obtenues avec chaque échantillon.

3° - Compensation par référence à la fluorescence des produits accompagnant le 3-4 benzopyrène

L'assez bonne constance des spectres de fluorescence de divers échantillons préparés à partir d'une même solution permet de compenser systématiquement les perturbations apportées par les variations de l'intensité absolue signalés précédemment. On s'arrange pour que les substances à doser, se trouvent à la même concentration dans les divers échantillons à comparer (ce qui est le cas, si on utilise une technique de dosage par surcharge). On agit alors sur le gain du photomultiplicateur de façon à ramener à une même valeur les réponses de l'appareil à la fluorescence des substances étrangères (à une longueur d'onde, λ o , à laquelle le 3-4 benzopyrène n'est pas fluorescent). Les rapports des pics du 3-4 benzopyrène, mesurés dans ces conditions, donnent les rapports des concentrations.

En effet :

Soient deux solutions complexes à comparer, A et B, de concentrations différentes en 3-4 benzopyrène mais de même concentration en substances étrangères.

Soient, 1 et 2, deux conditions de congélation que l'on suppose pouvoir reproduire à volonté, pour la commodité du raisonnement.

1° - Supposons que l'on ait à comparer A1 et B1. Si la dilution est suffisante, on peut admettre que le rapport de la hauteur d'un même pic du 3-4 benzopyrène dans les deux solutions est égal au rapport des concentrations en 3-4 benzopyrène.

La réponse à la longueur d'onde λ o , à laquelle le 3-4 benzopyrène n'est pas fluorescent, est la même pour les deux échantillons, si le rendement de fluorescence des substances étrangères n'est pas influencé par la concentration en 3-4 benzopyrène (nous reviendrons plus loin sur cette supposition). On peut exprimer ceci par :

$$(A1)\ \lambda\ o = (B1)\ \lambda\ o.$$

2° - Pour faire le dosage, on a à comparer A1 et B2. Si, pour enregistrer le spectre de B2, on agit sur la tension du photomultiplicateur, de façon à égaler les réponses à o avec les deux échantillons, on aura :

$$(B2)\ \lambda\ o = (A1)\ \lambda\ o = (B1)\ \lambda\ o.$$

On obtiendra donc avec B2 un spectre identique à celui enregistré en 1°, avec B1 (puisqu'avec la même tension du photomultiplicateur les spectres de B1 et de B2 ne diffèrent que par un facteur multiplicatif des ordonnées près). Donc le rapport des intensités des pics sera, comme en 1°, égal au rapport des concentrations.

L'hypothèse que nous avons formulée, relative à l'indépendance de la fluorescence des substances étrangères, vis à vis de la concentration en 3-4 benzopyrène, est vraisemblable, parce qu'en général la proportion de 3-4 benzopyrène par rapport aux substances étrangères est assez faible. Elle est justifiée par le fait qu'on a toujours observé une bonne proportionnalité entre les hauteurs du pic de dosage du 3-4 benzopyrène, mesuré dans ces conditions, et la concentration (à des concentrations inférieures à 1 γ/cm3).

C/ - TECHNIQUES DE DOSAGE

L'ensemble des remarques faites jusqu'ici, dans ce chapitre, nous a conduit à la mise au point de deux techniques de dosage par fluorescence à basse température, la première par comparaison avec des solutions étalons

à plusieurs dilutions et la seconde par comparaison de la solution à doser avec plusieurs solutions surchargées.

Ces techniques ont été décrites en détail, en F (bibliographie relative à nos propres travaux), nous ne reviendrons pas sur cette description.

Nous signalerons simplement que, dans le cas du dosage par simple comparaison, la compensation des variations dans l'intensité de fluorescence d'un échantillon congelé à l'autre, est faite par la répétition des comparaisons, et que, dans le cas du dosage par surcharge, nous appliquons la méthode de compensation, décrite plus haut, par référence à la fluorescence des substances étrangères à 4005 A, longueur d'onde à laquelle l'émission du 3-4 benzopyrène est très faible par rapport à celle obtenue à 4030 A (bande de dosage).

Comme pour la détection non quantitative, la finesse des bandes permet d'améliorer la sélectivité et la sensibilité, par rapport aux techniques classiques.

D/ - PRECISIONS DES DOSAGES

Nous avons déterminé la précision de la technique sur un exemple pratique. Un goudron de fumée de cigarettes, obtenu dans des conditions qui fournissent un mélange particulièrement complexe et très difficile à doser (82) par les techniques classiques, a été débarrassé du 3-4 benzopyrène qu'il contenait, par chromatographie. La solution complexe obtenue, exempte de 3-4 benzopyrène, est additionnée de 1/20.000 de 3-4 benzopyrène, par rapport au poids sec.

Des dosages sont effectués par les deux méthodes sur cette solution. Les erreurs ont toujours été inférieures à 10%. L'erreur moyenne était de 5%

dans le cas du dosage par comparaison simple, et de 4% pour le dosage par surcharge. Cette précision est conservée même pour les solutions très diluées (10^{-4} /cm3), à condition de prendre de grandes précautions pour éviter les contaminations accidentelles par du 3-4 benzopyrène.

IV - APPLICATIONS PRATIQUES

Nos techniques ont été appliquées à divers problèmes intéressant la biologie.

A/ - ANALYSES DE FUMEES DE PAPIER DE CIGARETTES ET DE CIGARETTES

Ces expériences sont décrites, en détail, dans la thèse de HUBERT-HABART (82). Elles ont montré que la technique de fluorescence à basse température permettait de détecter et de doser le 3-4 benzopyrène à un niveau beaucoup moins poussé de fractionnement et souvent avec une précision meilleure que les techniques classiques.

B/ - ECHAPPEMENT DE MOTEUR A EXPLOSION (en collaboration avec MM. AVY et BENARIE

L'analyse, dans ce cas, est relativement aisée, puisqu'il a été possible d'obtenir des résultats qui semblent satisfaisants, en fluorescence à basse température et même à la température ordinaire, sans aucun fractionnement préalable. Le spectre de fluorescence, à -190°C et en présence d'octane d'un extrait par le cyclohexane du matériel obtenu par filtration des gaz d'échappement d'un moteur de "2 CV," comporte de nombreuses bandes, parmi lesquelles on reconnait des bandes du 3-4 benzopyrène (figure 43). Les dosages

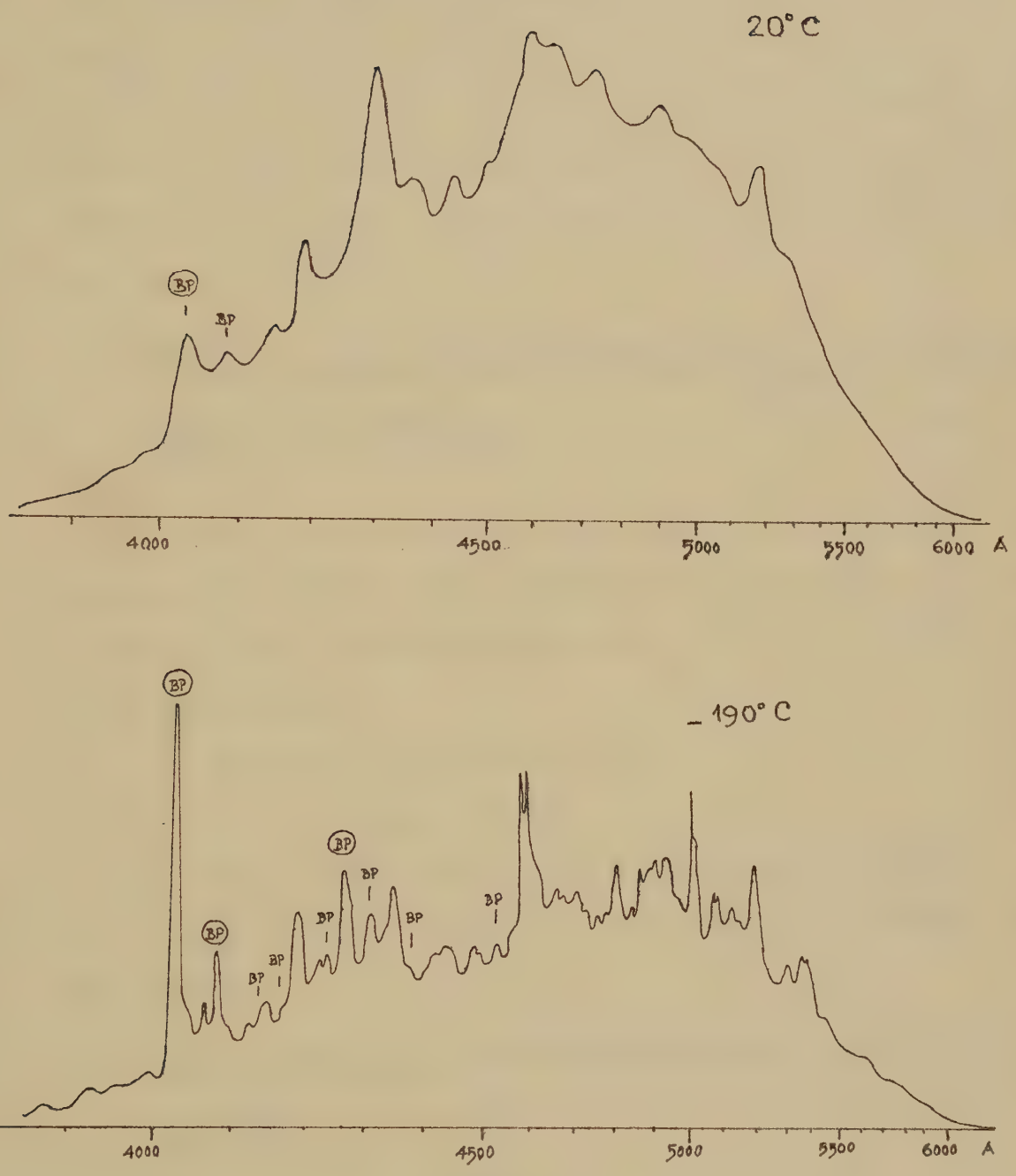


Figure 43

Spectres de fluorescence d'un extrait, par le cyclohexane, du matériel obtenu par filtration des gaz d'échappement d'un moteur à explosion.

- Spectre à 20°C : solution dans le cyclohexane
- Spectre à -190°C : solution dans un mélange à parties égales d'octane normal et de cyclohexane.

Les pics marqués BP sont dûs au 3-4 Benzopyrène
Les pics marqués (BP) ont servi pour les dosages
En ordonnées : déviations du galvanomètre

par surcharges, effectués sur trois de ces bandes, sont concordants, ils indiquent que les fumées d'échappement, pour 1h.30 au ralenti, contiennent 130 γ de 3-4 benzopyrène. Bien que les bandes du 3-4 benzopyrène n'apparaissent pas aussi nettement dans le spectre à la température ordinaire (figure 43), le dosage par fluorescnece à la température ambiante, est en accord avec le précédent.

C/ - DETECTION ET DOSAGE DU 3-4 BENZOPYRENE DANS LES ALCOOLS DISTILLES DESTINES A LA CONSOMMATION

Comme nous avions remarqué que presque tous les solvants commerciaux contiennent des petites quantités de 3-4 benzopyrène, nous avons recherché et détecté le 3-4 benzopyrène dans les alcools distillés destinés à la consommation.

Un dosage dans le kirsch a donné :

0,4 m γ /cm3

Rappelons que dans la fumée d'une cigarette, on dose 10 m de 3-4 benzopyrène (82), mais la quantité absorbée par le fumeur doit être moindre.

D/ - ESSAI DE DOSAGE DU 3-4 BENZOPYRENE DANS L'EAU DU RESEAU DE DISTRIBUTION URBAIN

On ne peut extraire de l'eau des canalisations urbaines, aucune quantité décelable de 3-4 benzopyrène, par agitation avec un solvant organique.

Si ce procédé d'extraction est correct on peut conclure que l'eau

analysée contenait moins de 0,005 m γ de 3-4 benzopyrène par cm3.

E/ - DETECTION DE METABOLITES FORMES "IN VIVO" A PARTIR D'HYDROCARBURES AROMATIQUES (en collaboration avec Madame DAUDEL)

On sait que les hydrocarbures cancérigènes se fixent sur les protéines cellulaires, en très petite quantité (15) (16) (50)(83). Nous avons utilisé la technique de détection par fluorescence à basse température, pour essayer de caractériser les composés qui résultent de cette fixation. Cette étude pouvait fournir des renseignements sur les modes de fixation de l'hydrocarbure, afin de rechercher si certains modes de fixation ne sont pas spécifiques des hydrocarbures cancérigènes.

Après badigeonnage de souris par du 3-4 benzopyrène, on a extrait les protéines de la peau, qui sont ensuite hydrolysées, puis dégradées plus profondément par l'action de l'hydrazine. Cette dernière action libère des composés dont on peut détecter les spectres de fluorescence à basse température. L'examen des spectres obtenus par excitation à 3650 A, d'une part, et à 3100 A, d'autre part, montre que les composés détectés pourraient être des dérivés substitués du chrysène et du 1-2 benzanthracène (figure 44).

Ceci est en accord avec les théories qui ont été avancées jusqu'à présent (13) (14), selon lesquelles les hydrocarbures cancérigènes se fixeraient par certains groupes de carbones adjacents appelés "régions K". La figure 45 montre,d'une part,le 3-4 benzopyrène avec l'indication de ses régions K, d'autre part, les composés que nous avons peut-être détectés, et qui dérivent du précédent par rupture des cycles au niveau des régions K.

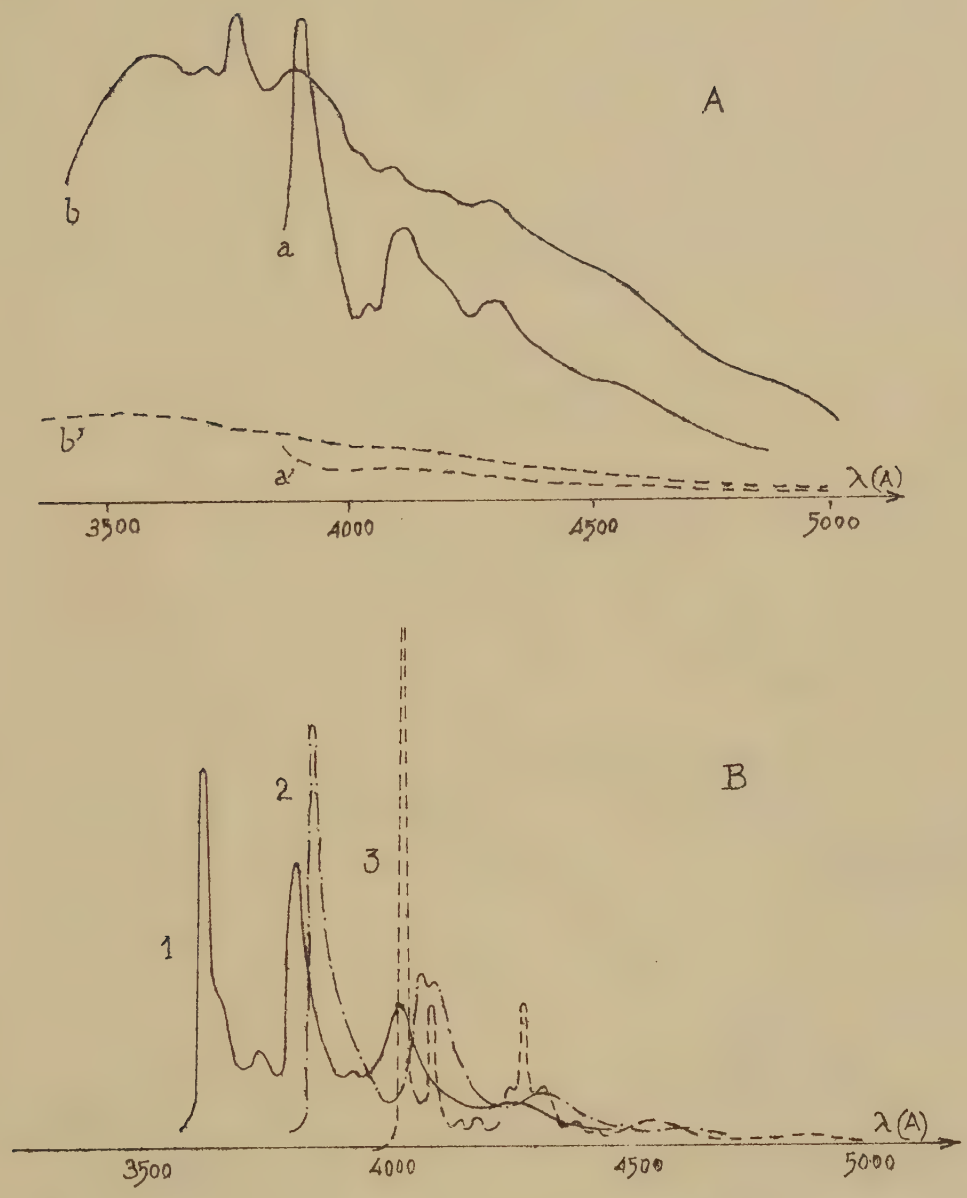
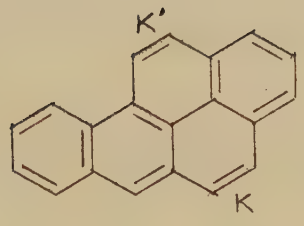


Figure 44

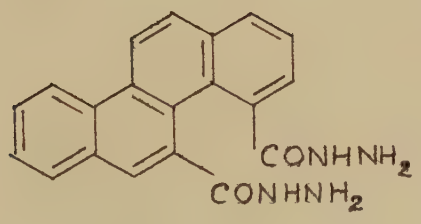
Courbes spectrales d'énergie de la fluorescence à -190°C

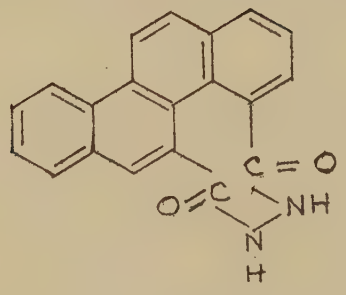
Fig 44 A - Extraits des hydrazinolysats, en solution dans un mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et de n-pentane.
Spectre a) Excitation 3650 A, souris badigeonnées.
Spectre a')Excitation 3650 A, souris non badigeonnées.
Spectre b) Excitation 3100 A, souris badigeonnées
Spectre b')Excitation 3100 A, souris non badigeonnées.

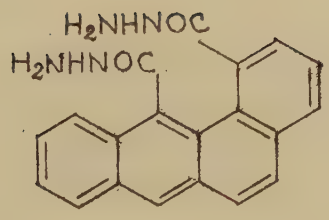
Fig.44 B - 1 Chrysène : solution de concentration inférieure à 1 γ /cm3 dans un mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et de n-pentane. Excitation 3100A
2 1-2 benzanthracène : mêmes conditions que pour le chrysène
3 3-4 benzopyrène : solution à 1 γ /cm3 dans le n-pentane. Excitation 3650 A.



3-4 benzopyrène







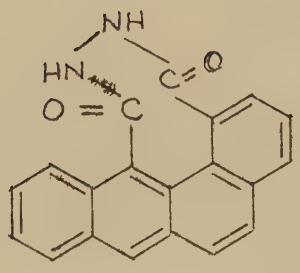


Figure 45

Le 3-4 benzopyrène et les dérivés vraisemblablement obtenus par rupture du composé résultant de la liaison "in vivo" du 3-4 Benzopyrène et de protéines.

RESUME

L'étude approfondie des propriétés physicochimiques de substances douées d'activités biologiques spécifiques apporte des éléments susceptibles d'aider à la compréhension des phénomènes qu'elles provoquent chez l'animal.

C'est pour cette raison qu'ont été entreprises les études présentées ici, sur la luminescence d'hydrocarbures cancérigènes et apparentés.

Les éléments que nous apportons sont les suivants :

1° - Les transitions de l'état premier triplet à l'état fondamental d'hydrocarbures aromatiques alternants à 5 et à 6 noyaux, donnent lieu à l'émission de photoluminescence lente dont le rayonnement est situé dans les régions spectrales rouge sombre et infrarouge (phosphorescence $T \rightarrow S$).

2° - On constate que les solutions congelées à basse température de certaines de ces substances donnent une photoluminescence lente dont le rayonnement est émis au cours de transitions de l'état premier singulet à l'état fondamental (fluorescence retardée). La persistance de l'émission après l'arrêt de l'excitation serait due à ce que le phénomène résulte du mécanisme suivant : deux molécules, portées dans leur premier triplet par l'irradiation excitatrice, interagissent en additionnant leur énergie d'excitation, pour porter l'une des deux molécules dans son état premier singulet, l'autre molécule retournant à l'état fondamental.

3° - L'affinement produit dans les bandes de fluorescence d'hydrocarbures, par l'utilisation de certains solvants congelés à basse température permet d'améliorer la spécificité, la sélectivité et la sensibilité des détections et des dosages de ces substances, sans nuire à la précision. Cette technique permet de fournir certaines informations à des problèmes d'intérêt biologique.

Nous résumerons maintenant les principaux faits qui ont conduit à ces trois conclusions :

1° - Phosphorescence dans le rouge et le proche infrarouge

Les parties des spectres de phosphorescence enregistrées dans le rouge et le proche infrarouge pour le 3-4 benzopyrène et trois hydrocarbures à 6 cycles benzéniques et certains de leurs dérivés méthylés, ont été attribuées à des transitions du premier triplet à l'état fondamental de ces substances. Les faits suivants permettent de faire cette attribution.

a) Persistance de ces émissions après purification par chromatographie, des échantillons à notre disposition. Pour le 3-4 benzopyrène, identité de ces parties de spectre, pour divers échantillons commerciaux contenant des impuretés différentes.

b) Analogie du spectre des dérivés méthylés avec celui de l'hydrocarbure fondamental correspondant, et déplacement bathochrome des premiers par rapport aux derniers, du même ordre de grandeur que ceux observés en absorption et en fluorescence.

c) Distance, en cm^{-1}, de ces spectres aux spectres de fluorescence correspondants, de l'ordre de 10.000 cm-1.

d) Parfois, structure vibrationnelle de ce spectre analogue à celle du spectre de fluorescence correspondant.

e) Analogie de la structure vibrationnelle des spectres enregistrés dans le rouge pour les différents hydrocarbures non substitués. Déplacement bathochrome des spectres des hydrocarbures les plus lourds par rapport aux hydrocarbures comportant un plus petit nombre de cycles benzéniques.

f) Pour le 3-4 benzopyrène, existence d'un spectre d'absorption de très faible coefficient moléculaire, de solutions dans l'iodure d'éthyle ou sous pression d'oxygène. Ce spectre est à peu près symétrique du spectre enregistré dans le rouge par rapport à une droite verticale située au niveau de la bande la plus intense de plus grande fréquence de ce dernier spectre. Il correspond probablement à des transitions $S_0 \rightarrow T_1$.

g) Coïncidence approximative, pour les hydrocarbures non substitués, de la fréquence de la bande intense de plus grande fréquence, avec le résultat d'un calcul théorique de HALL.

2° - Fluorescence retardée

L'influence de diverses conditions expérimentales sur la manifestation du phénomène de fluorescence retardée du 3-4 benzopyrène en solution congelée à basse température, a été étudiée en détail. Les résultats obtenus suggèrent que ce phénomène résulte de l'interaction deux à deux, de molécules de 3-4 benzopyrène dans leur état premier triplet. Cette interaction conduirait à l'excitation d'une des deux molécules de ces couples dans son état premier singulet et au retour de l'autre dans son état fondamental. Cette dernière transition semble énergétiquement permise, pour un couple isolé, puisque l'énergie du premier singulet est moins de deux fois celle du premier triplet. L'interdiction du passage des états triplets aux états singulets serait ici levée si les deux molécules des couples envisagés se placent de façon à ce que leurs spins totaux soient dirigés en sens contraire et s'annulent dans le système des deux molécules considéré comme un tout. Cette image semble s'accorder avec les résultats de calculs théoriques effectués par COLPA, qui montrent que la transition envisagée est possible pour un couple de molécules proches l'une de l'autre, et placées dans des plans parallèles.

Voici les faits qui suggèrent cette interprétation :

a) les impuretés présentes dans les échantillons commerciaux ne semblent pas nécessaires à l'apparition du phénomène.

b) Deux photons paraissent nécessaires à l'émission d'un photon de fluorescence retardée, puisque l'intensité de fluorescence retardée est approximativement proportionnelle au carré de l'éclairement excitateur.

c) Il intervient une interaction entre les molécules du corps dissous puisque le rendement de la fluorescence retardée croit avec la concentration.

d) L'excitation du 3-4 benzopyrène dans son état premier triplet serait suffisante pour faire apparaître le phénomène. En effet, il est possible d'exciter la fluorescence retardée par des rayonnements de longueurs d'ondes plus grandes que celles du rayonnement de la fluorescence retardée elle-même, donc composés de photons d'énergie trop faible pour porter directement le 3-4 benzopyrène dans son état premier singulet. Des colorants dont le premier singulet est plus bas que celui du 3-4 benzopyrène sont ajoutés dans la solution pour capter l'énergie du rayonnement excitateur. On constate que la fluorescence retardée n'est excitée que dans le cas où le colorant ajouté à son état premier triplet plus haut que celui du 3-4 benzopyrène. Or, c'est cette disposition relative des niveaux premiers triplets qui est requise pour qu'un transfert d'énergie d'excitation T - T, du Type de FORSTER, puisse se produire des molécules du colorant aux molécules du 3-4 benzopyrène. Il est donc probable que dans ces expériences, la fluorescence retardée soit excitée par cette voie.

e) La décroissance de la fluorescence retardée paraît exponentielle en fonction du temps écoulé après l'arrêt de l'excitation et la constante de temps est environ la moitié de celle de la luminescence T S. Ceci est en accord avec l'interprétation proposée.

L'étude de l'effet de la température montre que les chocs moléculaires interviennent probablement dans le phénomène, ce qui suggère que la formation ou la destruction d'une liaison entre les molécules constituant les couples serait nécessaire pour l'apparition du phénomène.

La proximité de deux molécules de 3-4 benzopyrène serait rendue assez probable par l'emprisonnement de molécules de 3-4 benzopyrène deux à deux dans les mailles du réseau formé par le solvant congelé. En effet, une certaine aggrégation des molécules de 3-4 benzopyrène est à prévoir au moment du refroidissement, puisque les solutions sont alors sursaturées.

Pour rendre compte du rendement relativement important de fluorescence retardée obtenu dans certaines conditions, il faudrait peut-être faire intervenir, pour la double excitation d'un couple, le passage par un état monoexcité de durée de vie plus longue que celle du premier triplet du 3-4 benzopyrène. Cet état intermédiaire pourrait être un état de transfert de charge, dans lequel l'électron excité émigre sur l'autre molécule du couple. Cette dernière hypothèse rend compte d'un certain nombre de faits qui étaient difficilement explicables sans son intervention.

Fluorescence

a) 3-4 benzopyrène

Le spectre de fluorescence du 3-4 benzopyrène en solution dans l'octane à -190°C permet de détecter cette substance à des concentrations de 10^{-10} g/cm3, avec une spécificité et une sélectivité accrues par rapport aux méthodes classiques.

On peut utiliser cette technique quantitativement à mieux que ± 10% près. La principale difficulté à surmonter pour les dosages est le manque de reproductibilité de l'intensité de la fluorescence d'une solution, d'un échantillon congelé à l'autre. Ceci semble dû à ce que ces solutions forment un agglomérat de cristaux par congélation.

Deux techniques de dosage sont présentées :

1 - On compare la hauteur d'un pic de fluorescence de la solution à doser avec celle d'une solution étalon. Les solutions sont diluées suffisamment pour éliminer les phénomènes d'inhibition de la fluorescence et de réabsorption de son rayonnement par le 3-4 benzopyrène lui-même et par les substances qui l'accompagnent. Pour pallier le manque de reproductibilité, les comparaisons sont répétées avec plusieurs échantillons congelés des mêmes solutions.

2 - On compare la hauteur d'un pic de fluorescence de la solution à doser avec celle de cette même solution, dans laquelle a été ajoutée une quantité connue de 3-4 benzopyrène (dosage par surcharge, qui compense les perturbations apportées par les substances qui accompagnent le 3-4 benzopyrène). On compense les variations qui ont pu se produire d'un échantillon à l'autre dans le rendement apparent de fluorescence du 3-4 benzopyrène par unité de concentration, en ajustant à la même valeur la réponse de l'appareil à la fluorescence des impuretés. Les résultats de cette méthode de compensation sont corrects parce que les changements dans la structure physique des échantillons affectent dans des proportions analogues la fluorescence de la plupart des composés organiques. Ceci est confirmé par l'observation de la constance (à un facteur multiplicatif près) du spectre de fluorescence d'un échantillon congelé à l'autre, préparé à partir d'une même solution contenant de nombreuses substances fluorescentes.

Les résultats de ces techniques sont contrôlés par des dosages effectués sur des solutions complexes contenant des quantités connues de 3-4 benzopyrène (goudron débarrassé de 3-4 benzopyrène par chromatographie et additionné de 3-4 benzopyrène en quantité connue).

Des applications sont présentées, à la recherche et au dosage du 3-4 benzopyrène dans la fumée de cigarette, dans les produits d'échappement des moteurs à explosion, dans les alcools distillés destinés à la consommation, dans l'eau des canalisations de distribution urbaine.

b) Autres substances

La technique de détection par fluorescence à basse température des autres substances étudiées ne donne pas d'aussi bons résultats que dans le cas du 3-4 benzopyrène. Cependant, on constate une amélioration par rapport aux techniques classiques.

Le problème de l'interaction "in vivo" des hydrocarbures et de constituants cellulaires a été étudié par cette méthode.

B I B L I O G R A P H I E

1° - Références à nos propres travaux

A - Détection quantitative du 3-4 benzopyrène formé par combustion du papier à cigarettes et du tabac.
par R. LATARJET, J.L. CUZIN, M. HUBERT-HABART, B. MUEL et R. ROYER
Bull. Cancer, 43, 180, 1956

B - Etude du dibenzo-3-4-9-10 pyrène : Spectre de fluorescence et séparation chromatographique du benzo-3-4 pyrène.
par B. MUEL, M. HUBERT-HABART, et Ng. Ph, BUU-HOI
J. Chim. Phys. 54, 483, 1957.

C - Spectre de phosphorescence du benzo-3-4 pyrène en solution congelée à -180°C.
par B. MUEL et M. HUBERT-HABART
J. Chim. Phys. 55, 377, 1958.

D - Effet inhibiteur de sels minéraux oxygénés sur la formation du benzo-3-4 pyrène lors de la combustion du papier à cigarettes.
C.R. Acad. Sc. Paris, 246, 1440, 1958.
par M. HUBERT HABART, B. MUEL, R. ROYER et R. LATARJET.

E - Premier triplet d'hydrocarbures aromatiques polycycliques :
1 - Spectres de phosphorescence dans le rouge et le proche infrarouge de solutions congelées à -180°C.
2 - Premier triplet et activité cancérigène
par B. MUEL et M. HUBERT-HABART
IVe Congrès de spectroscopie moléculaire, Bologne, 1959 (sous presse)

F - La production du Benzo-3-4 pyrène dans les cigarettes à papier imprégné de sulfamate d'ammonium.
par J.L. CUZIN, M. HUBERT-HABART, B. MUEL, R. ROYER, et R. LATARJET
Bull. Soc. Chim. Fr. 982, 1960.

G - Caractérisation et dosage du 3-4 benzopyrène par spectrophotométrie de luminescence à -190°C.
par B. MUEL et G. LACROIX
Bull. Soc. Chim. Fr. 2139, 1960.

H - Luminescence d'hydrocarbures aromatiques. Applications à la biologie
par B. MUEL, G. LACROIX, L. MELESE.
Proc. of the 3rd Int. Congress on Photobiology in : Progress in Photobiology. B.C. CHRISTENSEN and B. BUCHMANN (Editors) p. 460, 1960. ELSEVIER

I - Recherche de métabolites liés aux protéines de peau de souris badigeonnée par du 3-4 benzopyrène.
par P. DAUDEL, B. MUEL, G. LACROIX, G. PRODI.
J. Chim.Phys. 59, 263, 1962.

2° - Références citées dans le texte

(1) HIEGER I.
Biochem. J. 24, 505, 1930.

(2) YAMAGIWA K., ICHIKAWA K.
Mitteil. Med. Fak. Univ. Tokyo 15, 295, 1916.

(3) KENNAWAY E.L.
J. Path. Bact. 27, 233, 1924

(4) ZANETTI J.E., EGLOFF G.
J. of Ind. and Eng. Chem. 9, 474, 1917.

(5) BLOCH Br., DREIFUSS W.
Schw. Med. Wochensch. 51, 1033, 1921.

(6) KENNAWAY E.L.
Biochem. J. 24, 497, 1930.

(7) COOK J.W., HEWETT C., HIEGER I.
Nature 130, 926, 1932 et
J. Chem. Soc. 136, 395, 1933.

(8) ROFFO A.H.
Bol. Inst. Med. Explt. Estud. Cancer, Buenos-Ayres 16, 297, 1939.

(9) KOTIN P.
Canc. Res. 16, 375, 1956.

(10) COOPER R.L., LINDSEY A.J.
B.J. of Cancer 9, 304, 1955.

(11) KOTIN P., FALK H.L., THOMAS M.
Arch. Ind. Hyg. 9, 164, 1954.

(12) WEIGERT F., MOTTRAN J.C.
Canc. Res. 6, 97, 1946.

(13) DAUDEL R.
Rev. Sc. 84, 37, 1946

(14) PULLMAN A., PULLMAN B.
Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire, Masson, Paris, 1955.

(15) MILLER E.C.
Canc. Res. 10, 232, 1950 et 11, 100, 1951.

(16) TARBELL D.S. et All.
Canc. Res. 16, 37, 1956

(17) SAWICKI E., STANLEY T.W., HAUSER T.R.
Int. J. Air Pollution 2, 253, 1960.

(18) DIKOUN P.P.
Voproci Onkologii 5, 672, 1959

(19) KLING A., HEROS M.
C.R. Acad. Sc. Paris 208, 2075, 1939 et 212, 348, 1941.

(20) BRUCE W.F.
J. Am. Chem. Soc. 63, 304, 1941.

(21) MILLER J.A., BAUMANN C.A.
Canc. Res. 3, 223, 1943

(22) BERENBLUM I., SCHOENTAL R.
J. Chem. Soc. 1017, 1946.

(23) SCHOENTAL R., SCOTT E.J.Y.
J. Chem. Soc. 1683, 1949.

(24) MOODIE M.M., REID C.
Brit. J. of Cancer 8, 380, 1954

(25) BIRKS J.B.
Nature 190, 232, 1961

(26) MASON R.
Brit. J. of Cancer 12, 469, 1958

(27) SUNG S.
J. Chim. Phys. 59, 633, 1962

(28) CHALVET O., DAUDEL P., DAUDEL R., MOSER C., PRODI G.
In : Mécanique ondulatoire et Biologie moléculaire, Ed. Revue d'Optique, Paris, 1961.

(29) TERRIEN J., DESVIGNES F.
Revue d'Optique 27, 451, 1948

(30) WILHM H.
Revue d'Optique 33, 425, 1954

(31) MIDDLETON W.E., SANDERS C.L.
J. Opt. Soc. Am. 41, 419, 1951.

(32) JACQUEZ J.A.
J. Opt. Soc. Am. 45, 781, 1955

(33) VISWANATH G., KASHA M.
J. Chem. Phys. 24, 574, 1956.

(34) KASHA M., NAUMAN R.V.
J.Chem. Phys. 17, 516, 1949

(35) LEWIS G.N., KASHA M.
J. Am. Chem. Soc. 66, 2100, 1944

(36) PRINGSHEIM P.
Fluorescence and Phosphorescence. Interscience 1949.

(37) KASHA M.
J. Chem. Phys. 20, 71, 1952 et
LEWIS G.N., KASHA M.
J. Am. Chem. Soc. 67, 994, 1945.

(38) ILINA A.A., CHPOLSKII E.V.
Izvest. Akad. Naouk SSSR, Ser. Phys. 15, 585, 1951.

(39) CRAIG D.P., ROSS I.G.
J. Chem. Soc. 1589, 1954.

(40) MIESCHER G., ALMASY F., KLAUI K.
Biochem. Z. 287, 189, 1936

(41) HALL G.G.
Trans. of Farad. Soc. 53, 573, 1957.

(42) CHPOLSKII E.V., ILINA A.A.
Journal Experimentalnoi i Theoretitcheskoi Physiki 21, 142, 1951.

(43) CHPOLSKII E.V., GIRDJIIAUSKAITE E.A.
Optica i Spectroscopiia 4, 620, 1958.

(44) EVANS D.F.
J. Chem. Soc. 1351, 1957.

(45) FRIEDEL R.A., ORCHIN M.
U.V. Spectra of aromatic compounds, Wiley,New-York 1951.

(46) KANDA Y., SPONER H.
J. of Chem. Phys. 28, 798, 1958

(47) JONES R.N.
J. Amer. Chem. Soc. 62, 148, 1940

(48) HALL G.G.
Proc. Roy. Soc. A 213, 113, 1952

(49) BIRKS J.B.
Nature 191, 761, 1961

(50) BHARGAVA P.M., HEIDELBERGER C.
J. Amer. Chem. Soc., 78, 3671, 1956.

(51) JABLONSKI A.
Z. f. Phys. 94, 38, 1935

(52) LEWIS G.N., LIPKIN D., MAGEL T.T.
J. Am. Chem. Soc. 63, 3005, 1941

(53) MARTINEZ A.
Thèse 3° Cycle, Bordeaux 1962

(54) DIKOUN P.P.
Zhur. Experimentalnoi i theoretitcheskoi Phyziki 20, 193, 1950

(55) STEVENS B., HUTTON E., PORTER G.
Nature 185, 917, 1960

(56) WILLIAMS R.
J. Chem. Phys. 28, 577, 1958

(57) FÖRSTER T., KASPER K.
Z. Electrochem. 59, 976, 1955

(58) FERGUSON J.
J. Chem. Phys. 28, 765, 1958

(59) STEVENS B., HUTTON E.
Nature 186, 1045, 1960
Nature 190, 166, 1961
STEVENS B.
Nature 192, 725, 1961

(60) BLAKE N.W., Mc CLURE D.S.
J. Chem. Phys. 29, 722, 1958

(61) SPONER H., KANDA Y., BLACKWELL L.A.
J. Chem. Phys. 29, 721, 1958

(62) PRIKHOT'KO A.F., SHPAK M.T.,
Optics and Spectroscopy, 6, 73, 1959

(63) ROUSSET A., LOCHET R., LACUEILLE R., MEYER Y.
C.R. Acad. Sc. Paris 248, 2045, 1959

(64) PARKER C.A., HATCHARD C.G.
Proc. Chem. Soc. 147, avril 1962

(65) WEIGERT F., MOTTRAM J.C.
Nature 145, 895, 1940

(66) COUPRON C.
Thèse 3°cycle, Bordeaux 1962

(67) ERMOLAEV V., TERENIN A.
J. Chim. Phys. 55, 698, 1958

(68) FÖRSTER T.
Discuss. Farad. Soc. n° 27, 7, 1959

(69) SOEDERBORG B.
Ann. der Phys. 41, 381, 1913

(70) COLPA J.P.
5° Symposium Européen de Spectroscopie Moléculaire, Amsterdam 1961
et communication personnelle.

(71) STEVENS B.
Spectrochimica Acta 18, 439, 1962

(72) LYONS L.E.
J. Chem. Soc. 5001, 1957

(73) ELEY D.D.
Rechearch 12, 293, 1959

(74) ROUSSET A.
Communication personnelle

(75) URBACH F., PEARLMAN F.
J. Opt. Soc. Am. 36, 369, 1946

(76) WEDGWOOD P., COOPER R.L.
Chemistry and Industry 1066, 1951

(77) BOWEN E.J., WOKES F.
Fluorescence of solutions, Longmans éditeur, 1953

(78) DIKOUN P.P.
Voproci Onkologii 7, 42, 1961

(79) BOWMAN R.L., CAULFIELD P.A., UDENFRIEND S.
Science 122, 32, 1955

(80) WEST W.
in Chemical Applications of Spectroscopy p. 707
WEISSBERGER A. Edit or
Intersoience, New-York.

(81) ILINA A.A.
Izvest. akad. Naouk SSSR, Ser. Phys. 15, 771, 1951

(82) HUBERT-HABART M.
Thèse Paris 1960

(83) WOODHOUSE D.L.
B.J. of Cancer 8, 346, 1954
MOODIE M.M., REID C., WALLICK C.A.
Canc. Res. 14, 367, 1954

TABLE DES MATIERES

Pages

REMERCIEMENTS 1

AVANT-PROPOS 4

CHAPITRE I

HISTORIQUE

HISTORIQUE 9

CHAPITRE II

APPAREILLAGE ET TECHNIQUES

I - APPAREILLAGE 15

A. Monochromateurs 18
B. Photomultiplicateurs 26
C. Dispositifs d'excitation et d'observation de la luminescence 32
D. Facteurs de correction 39
E. Enregistrement des courbes de décroissance des luminescence lentes 42
F. Cellule à température variable 45
G. Stablisation et enregistrement 47

II - TECHNIQUES DE PURIFICATIONS 48

A. Chromatographies des hydrocarbures aromatiques 48
B. Solvants 51

III - NOMENCLATURE 52

A. Fluorescence 52
B. Phosphorescence 52
C. Phosphorescence T → S 53
D. Fluorescence retardée 53
E. Phosphorescence 53

CHAPITRE III

SPECTRES DE PHOSPHORESCENCE T → S DANS LE ROUGE ET LE PROCHE INFRAROUGE 54

I - 3-4 BENZOPYRENE 56

A. Spectres de phosphorescence donnés par des échantillons de diverses origines 59
B. Purification jusqu'à spectre constant 61
C. Analyse du spectre "rouge" 62
D. Recherche du spectre d'absorption correspondant aux transitions So → T1 65
E. Comparaison avec un résultat théorique 66
F. Spectre de phosphorescence du 3-4 benzopyrène en solution dans l'acide borique, à la température du laboratoire 68
G. Conclusions 69

II - AUTRES SUBSTANCES 69

A. Solvants 69
B. Conditions expérimentales 72
C. Spectres d'absorption 72
D. Parties des spectres de phosphorescence attribuées à des transitions du premier triplet à l'état fondamental 72
E. Cas du pérylène 77

III - DETECTION DES HYDROCARBURES PAR PHOSPHORESCENCE 79

A. 3-4 benzopyrène 79
B. Autres substances 79

CHAPITRE IV

FLUORESCENCE RETARDEE 82

I - HISTORIQUE 82

II - DESCRIPTION DU PHENOMENE ETUDIE ET INFLUENCE DE DIVERSES CONDITIONS EXPERIMENTALES 86

A. Introduction 86
B. Quasi-identité du spectre de la fluorescence retardée et du spectre de fluorescence proprement dite 87
C. Influence des impuretés 90
D. Influence des solvants et de leurs formes de congélation 9I
E. Influence de cristaux de 3-4 Benzopyrène pouvant précipiter au refroidissement de la solution..... 93
F. Influence de la température 95
G. Rôle des gaz atmosphériques inclus ou dissous dans l'échantillon 99
H. Effet des changements de l'éclairement excitateur..... IOI
I. Influence de la concentration I08
J. Effet du changement de la longueur d'onde d'excitation. II4
K. Enregistrement des courbes de décroissance de la fluorescence retardée et de la luminescence $T_1 \rightarrow S_0$ et comparaison de la durée de vie des deux phénomènes II7
L. Effet de la lumière visible sur la fluorescence retardée excitée par de l'ultraviolet I2I
M. Excitation indirecte de la fluorescence retardée par un rayonnement visible, très peu absorbé par les molécules de 3-4 benzopyrène..... I24
N. Rappel des principales conclusions qui résultent de nos expériences I33

III - INTERPRETATION PROPOSEE 136

A. Enoncé de l'hypothèse 136
B. Justification 136
C. Explications des principales conclusions qui résultent de nos expériences 138
D. Difficultés rencontrées pour expliquer certains résultats 140
E. Hypothèses complémentaires 146
F. Conclusions 149

CHAPITRE V

FLUORESCENCE ET APPLICATION A LA DETECTION ET AU DOSAGE 150

I - SPECTRES DE FLUORESCENCE DE SOLUTIONS CONGELEES A -190°C 168

A. 3-4 benzopyrène 168
B. Autres substances 173

II - DETECTION DES HYDROCARBURES A L'AIDE DE LEUR SPECTRE DE FLUORESCENCE A BASSE TEMPERATURE 181

A. 3-4 benzopyrène 181
B. Autres substances 187

III - DOSAGE DU 3-4 BENZOPYRENE PAR FLUORESCENCE A BASSE TEMPERATURE 190

A. Difficultés inhérentes à l'utilisation de solutions congelées 191
B. Moyens de pallier ces difficultés 192
C. Techniques de dosage 194
D. Vérification de la précision des dosages 195

IV - APPLICATIONS PRATIQUES 196

A. Analyses de fumées de papier à cigarettes et de cigarettes 196
B. Echappement de moteur à explosion 196
C. Détection et dosage du 3-4 benzopyrène dans les alcools distillés destinés à la consommation 198
D. Essai de dosage du 3-4 benzopyrène dans l'eau du réseau de distribution urbain 198
E. Détection de métabolites formés "in vivo" à partir d'hydrocarbures aromatiques 199

RESUME 202

BIBLIOGRAPHIE 207

TABLE DES MATIERES 214

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"Fluorescence et transferts d'énergie chez les molécules protéiques".

Vu et approuvé :

Paris, le 18 Septembre 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE